



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 198 41 299.1

**Anmeldetag:** 10. September 1998

**Anmelder/Inhaber:** Professor Dr. med. Winfried Siffert,  
Essen, Ruhr/DE

**Bezeichnung:** Nukleinsäuresequenz codierend für die  
Gß3-Untereinheit des humanen G-Proteins

**IPC:** C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der  
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Mai 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the German Patent and Trademark Office.

W. Müller

BEST AVAILABLE COPY

GS/jo 980364  
10. September 1998

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Nukleinsäuresequenz codierend für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, sowie die Verwendung von G $\beta$ 3-Untereinheiten der G-Proteine zur Ermittlung des Risikos, an einer Krankheit, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) haben eine herausragende Bedeutung bei der intrazellulären Signaltransduktion. Sie vermitteln die Weiterleitung extrazellulärer Signale nach Stimulation von Hormonrezeptoren und anderen Rezeptoren, welche nach Rezeptoraktivierung eine Konformationsänderung durchmachen. Dies führt zur Aktivierung von G-Proteinen, welche nachfolgend intrazelluläre Effektoren (z.B. Ionenkanäle, Enzyme) aktivieren oder hemmen können. G-Proteine steuern die intrazelluläre Signalverarbeitung nach hormoneller Stimulation heptahelikaler Rezeptoren in der Zellmembran, aber auch nach Stimulation von Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Zu den regulierten Zellfunktionen gehören unter anderem Zellteilung und Zellwachstum, Kontraktion, Freisetzung von Zellinhaltsstoffen u.v.m..

Heterotrimere G-Proteine sind aus drei Untereinheiten, den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten, zusammengesetzt. Bislang wurden mehrere unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten, 5  $\beta$ -Untereinheiten und ca. 12  $\gamma$ -Untereinheiten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden nachgewiesen (Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M., Signaltransduction by G proteins: 1994 edition. J.Recept.Res. 15:213-252,1995; Offermans, S. and Schultz, G.

Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 350:329-338, 1994; Nürnberg, B., Gudermann, T. and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. J. Mol. Med. 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80:249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G proteins. FASEB J. 9:1059-1066, 1995).

Die rezeptorvermittelte Aktivierung bestimmter  $\alpha$ -Untereinheiten kann durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin (PTX) gehemmt werden. Dazu gehören insbesondere die  $\alpha$ -Isoformen  $\alpha$ -i1,  $\alpha$ -i2 und  $\alpha$ -i3 sowie unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten. Solche G-Proteine werden auch als "PTX-sensitive G-Proteine bezeichnet.

$\beta\gamma$ -Untereinheiten erfüllen wesentliche Funktionen bei der G-Protein-Aktivierung sowie bei der Modulation intrazellulärer Reaktionen. Alle bisher bekannten G-Protein- $\beta$ -Untereinheiten weisen auf der Ebene der Nukleotidsequenz und auf der Ebene der Aminosäuresequenz hohe Homologien auf. Dabei werden diese Ähnlichkeiten nicht nur innerhalb der humanen  $\beta$ -Untereinheiten ( $G\beta 1$ ,  $G\beta 2$ ,  $G\beta 3$ ) gefunden, sondern auch im Vergleich zu  $\beta$ -Untereinheiten anderer Spezies, beispielsweise Fruchtfliege oder Hefe.

Kürzlich konnte im humanen GNB3-Gen, das für die  $G\beta 3$ -Untereinheit kodiert, eine Basenveränderung in Exon 10 (C825T) beschrieben werden, die zum alternativen Spleißen von Exon 9 führt. Das alternative Spleißen wird durch eine kryptische Spleißstelle in Exon 9 begünstigt, wobei der entfernt liegende Basenaustausch C825T das Spleißen verstärkt. Das alternative Spleißprodukt ( $G\beta 3s$ ) weist einen Verlust von 123 bp (= 41 Aminosäuren) auf. Das GNB3-825T-Allel ist mit gesteigerter

Aktivierbarkeit von G-Proteinen und der essentiellen Hypertonie assoziiert (Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. Nat.Genet. 18(1):45-48, 1998; Clapham, D.E. and Neer, E.J. G protein  $\beta\gamma$  subunits. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 37:167-203, 1997; Hamm, H.E. and Gilchrist, A. Heterotrimeric G proteins. Curr.Opin.Cell Biol. 8:189-196, 1996).

Dieses humane GNB3-Gen ist von Levine et al. (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T. Jr., Helman, L.J. und Ahn, T.G.

Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (6), 2329-2333 (1990)) beschrieben worden.

Gegenstand der Erfindung ist eine neue humane cDNA für die G $\beta$ 3-Untereinheit von humanem G-Protein.

Überraschenderweise hat es sich nämlich herausgestellt, daß es im humanen GNB3-Gen einen weiteren Polymorphismus gibt, der im folgenden "C1429T" genannt wird. Dieser Polymorphismus findet sich an Position 1429 der cDNA. Dies entspricht dem Exon 11 der prä-mRNA, jedoch außerhalb des offenen Leserahmens im 3' nicht-translatierten Bereich.

Dieser Polymorphismus steht in einem ausgeprägten Verteilungsungleichgewicht mit dem bekannten C825T-Polymorphismus, derart, daß nahezu alle GNB3-825C-Allele den Genotyp 1429C und nahezu alle GNB3-825T-Allele den Genotyp 1429T aufweisen. Somit eignet sich dieser Polymorphismus C1429T ebenso gut wie der Polymorphismus C825T zum Nachweis der gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen.

Der Polymorphismus C1429T ist bezogen auf die Sequenz der cDNA, wie sie von Levine und Mitarbeitern beschrieben wurde. Hierbei

kommt es an Position 1429 der cDNA zu einem Austausch des C durch ein T:

1381 ggcctgggtg gtatagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcac(c/t)a  
ctagggtcct

In Anhang 1 ist die vollständige cDNA-Sequenz aufgelistet.

Bezogen auf die genomische Sequenz des GBN3 Lokus, wie er von Ansari-Lari und Mitarbeitern beschrieben wurde (Ansari-Lari, M.A., Muzny, D.M., Lu, J., Lu, F., Lilley, C.E., Spanos, S., Malley, T. und Gibbs, R.A., A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. Genome Res. 6 (4), 314-326 (1996)), ist dieser Polymorphismus wie folgt lokalisiert (C59308T):

59281 TTGGCCCTGT GACTATGGCT CTGGCAC(C/T)AC TAGGGTCCTG  
GCCCTCTTCT TATTCATGCT

In Anhang 2 ist die vollständige genomische Sequenz aufgelistet.

Der Nachweis dieses Polymorphismus erfolgt durch dem Fachmann geläufige Methoden wie spezifische Hybridisierung, Sequenzierung, PCR- Reaktion mit anschließender Restriktionsanalyse, DNA - Chip- Technologie, single strand conformation polymorphism etc.. In einem beispielhaften Versuch erfolgte der Nachweis durch Amplifikation des entsprechenden Genabschnitts und anschließende Analyse des Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus, bei dem die Restriktionsenzyme *BanI*, *BshNI*, *Eco64I* oder deren Isoschizomere verwendet werden.

Als Ergebnis findet sich eine große Übereinstimmung zwischen dem Genotyp an Positionen 825 und 1429:

Genotyp an Position 825 der GNB3 cDNA	Genotyp TT bei Position 1429 der cDNA	Genotyp TC bei Position 1429 der cDNA	Genotyp CC bei Position 1429 der cDNA
TT 119	111 (93,3 %)	8 (6,7%)	0
TC 116	3 (2,6 %)	103 (88,8 %)	10 (8,6 %)
CC 124	0 (0 %)	2 (1,6 %)	122 (98,4 %)

Die neue Nukleinsäuresequenz kann zur Herstellung von Antisense-Arzneimitteln zur Therapie oder Prävention von Krankheiten dienen, wobei eine zu dieser Nukleinsäuresequenz komplementäre Nukleinsäuresequenz zur Herstellung des Antisense-Arzneimittels eingesetzt wird. Die Patienten können dabei z.B. mit Antisense-Oligonukleotiden oder Vektoren zur Verhinderung der Transkription oder Translation der G $\beta$ 3-Untereinheit behandelt werden.

Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung von von  $\beta$ 3-Untereinheiten der G-Proteine zur Ermittlung des Risikos, an einer Krankheit, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Obwohl die G $\beta$ 3s- Spleißvariante, die den Polymorphismus C1429T aufweist bzw. auf den Polymorphismus C825T zurückzuführen ist, in Kombination mit den G-Protein-Untereinheiten G $\alpha$ i2 und G $\gamma$ 5 ein funktionelles Heterotrimer bilden kann, war es unklar, auf welche Weise G $\beta$ 3s zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen führt.

Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die Untereinheit G $\beta$ 3s zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen führt. Der Nachweis der gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen erfolgte über die Transfektion der entsprechenden cDNAs und Expression von G $\beta$ 3 und G $\beta$ 3s im dem Fachmann wohlbekannten COS-7-Transfektionssystem. Hier zeigte sich, daß die Aktivierbarkeit von G-Proteinen nach Transfektion von G $\beta$ 3s gegenüber G $\beta$ 3

deutlich gesteigert ist (Fig.1). Zur Quantifizierung der Aktivierbarkeit von G-Proteinen wurde hier der Einbau von radioaktiv markiertem [35S]GTP $\gamma$ S in G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten nach Stimulation mit dem Peptid Mastoparan-7 (Mas-7) gemessen.

Ähnliche Ergebnisse lassen sich im Sf9-Insektenzellen-Expressionssystem erzielen (Fig.2). Hier wird der m2-muskarinerge Rezeptor zusammen mit den G-Protein-Untereinheiten G $\alpha$ i3 und G $\gamma$ 5 und entweder G $\beta$ 3 oder G $\beta$ 3-s im Sf9-System exprimiert. Nach Stimulation mit dem Agonisten Carbachol werden in Gegenwart von G $\beta$ 3-s eine gesteigerte Potenz und eine gesteigerte Effizienz des Agonisten Carbachol bezogen auf die Stimulierbarkeit von G-Proteinen beobachtet.

Diese Versuche zeigen, daß die Spleißvariante G $\beta$ 3-s für eine gesteigerte Aktivierung von G-Proteinen ursächlich verantwortlich ist. Ferner beweisen diese Versuche, daß das Protein sich für eine Gentherapie für Krankheiten, die mit einer solchen G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sind, im Sinne der Erzielung einer gesteigerten zellulären Reaktivität eignet.

Unter Krankheiten, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sind, sind solche Erkrankungen zu verstehen, bei denen das G-Protein in der Signaltransduktion involviert ist und seine Funktion nicht in physiologischer Weise erfüllt. Die Fehlsteuerung kann eine Reihe von Ursachen haben, beispielsweise eine Veränderung im Strukturgen oder eine veränderte Genexpression. Die vorliegende Erfindung betrifft Krankheiten, die mit dem oben beschriebenen GNB3-825T-Allel bzw. GNB3-1429T-Allel assoziiert sind. Dazu zählen Diabetes mellitus (Typ-2), Übergewicht und Adipositas, koronare Herzkrankheit, Immunerkrankungen infolge einer verstärkten Funktion des Immunsystems, und Risikoschwangerschaften mit der Gefahr einer vorzeitigen Geburt (Frühgeburt).

Die folgenden Beispiele beziehen sich zwar auf Untersuchungen mit dem GNB3-825T-Allel. Aufgrund der großen Übereinstimmung (Kopplungsgleichgewicht) zwischen dem Genotyp an Positionen 825 und 1429 sind diese Beispiele und die aus den Versuchsergebnissen gezogenen Schlußfolgerungen für das GNB3-1429T-Allel ebenso gültig.

## 1. Vorhersage des Diabetes mellitus (Typ-2)

Der Typ-2-Diabetes (Synonyme: Altersdiabetes, nicht-Insulinpflichtiger Diabetes) ist eine schwerwiegende Erkrankung mit hoher kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität. Genetische Einflüsse und Übergewicht tragen wesentlich zur Pathogenese bei. Der Typ-2-Diabetes beginnt häufig als Insulinresistenz, welche zunächst durch eine gesteigerte Insulinsekretion kompensiert wird, so daß die betroffenen Individuen symptomlos (euglykämisch) bleiben. Erst wenn die gesteigerte Insulinsekretion nicht mehr aufrecht erhalten werden kann, kommt es zum Diabetes mit gesteigerten Blutzuckerspiegeln. Auf zellulärer Ebene können Veränderungen in Komponenten der Insulinsignaltransduktion, z.B. bei Insulin- Rezeptor- Substrat 1 (IRS-1), PI-3-Kinasen, Proteinkinasen, etc. eine Insulinresistenz bewirken. Aber auch nach einer Zellstimulation mit Agonisten (z.B. Angiotensin II), die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren, kann eine zelluläre Insulinresistenz herbeigeführt werden. Die Wirkung einer nachfolgenden Stimulation mit Insulin ist dann deutlich vermindert (Polonsky, K.S., Sturis, J., and Bell, G.I. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - A genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. N.Engl.J.Med. 334:777-783, 1996; O'Doherty, R., Stein, D., and Foley, J. Insulin resistance. Diabetologia 40 Suppl 3:B10-5:B10-5, 1997; Kahn, C.R., Vicent, D., and Doria, A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. Annu.Rev.Med. 47:509-531, 1996; Hansen, T., Andersen, C.B., Echwald, S.M., Urhammer, S.A., Clausen, J.O., Vestergaard, H., Owens, D., Hansen, L., and Pedersen, O. Identification of a



common amino acid polymorphism in the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness, and the insulin sensitivity index. Diabetes 46(3):494-501, 1997; Folli, F., Kahn, C.R., Hansen, H., Bouchie, J.L., and Feener, E.P.

Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels - A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk.

J.Clin.Invest. 100:2158-2169, 1997; Zhang, Y., Wat, N., Stratton, I.M., Warren-Perry, M.G., Orho, M., Groop, L., and Turner, R.C. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and b3-adrenergic receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gen mutations. Diabetologia 39:1505-1511, 1996; Almind, K., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S., and Pedersen, O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 342:828-832, 1993; Laakso, M., Malkki, M., Kekäläinen, P., Kuusisto, J., and Deeb, S.S. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes. J.Clin.Invest. 94:1141-1146, 1994).

Diese G-Protein-Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung von IRS-1 an Serinresiduen, wodurch die durch Insulin induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresiduen reduziert wird. Als Folge davon kommt es zu einer reduzierten Interaktion von IRS-1 mit dem Insulinrezeptor und der PI-3-Kinase, d.h. zu einer verminderten Insulinwirkung. Eine gesteigerte Aktivierbarkeit von G-Proteinen, die durch das GNB3 825T-Allel und die damit verbundene Spleißvariante Gβ3-s in vivo bewirkt wird, verstärkt die Neigung zur Insulinresistenz deutlich.

Es hat sich nun gezeigt, daß bei gleichzeitigem Vorliegen von Mutationen in Komponenten der Insulinsignaltransduktion (IRS1-Gen, 3931A-Variante; Gly971Arg; p85α- regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase (1020 G →A; Codon 326 Met →Ile;

$\beta$ 3-adrenerger Rezeptor (Trp64Arg);  $\beta$ 2-adrenerger Rezeptor (hier insbesondere die Arg16Gly- Variante und die Gln27Glu-Variante); Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; Leptin oder der Leptinrezeptor), welche zur Insulinresistenz führen, und dem GNB3-825T-Allel, die Neigung zur Insulinresistenz und zum Diabetes drastisch ansteigt. Dieser Zusammenhang eröffnet die Möglichkeit, eine mit dem GNB3-825T-Allel assoziierte Diabetes mellitus vom Typ 2 zu diagnostizieren und eine derart genetisch bedingte Neigung zur Diabetes mellitus vom Typ 2 bei noch gesunden bzw. beschwerdefreien Personen vorherzusagen.

Zum Beweis wurde die DNA von über 700 Patienten mit Typ-2-Diabetes und von 1400 gesunden Kontrollpersonen gewonnen. Die Häufigkeiten des GNB3-825T-Allels und der IRS-1-Gly971Arg-Variante wurden verglichen. Tabelle I zeigt zunächst einen Vergleich der Allelfrequenzen bei Kontrollen und Fällen:

Tabelle I: Allelfrequenzen bei Kontrollen und Typ-2-Diabetikern

		Kontrollen			Diabetiker		
		Alle	Männer	Frauen	Alle	Männer	Frauen
Total, n		1464	962	502	720	320	400
Genotyp, n (%):							
GNB3	TT	116 (8)	83 (9)	33 (7)	61 (8)	32 (10)	29 (7)
	TC	585 (40)	360 (37)	225 (45)	345 (48)	161 (50)	184 (46)
	CC	763 (52)	519 (54)	244 (49)	314 (44)	127 (40)	187 (47)
	FT	0.28	0.27 <sup>1</sup>	0.29	0.32 <sup>2</sup>	0.35 <sup>3</sup>	0.30
IRS1	AA	5 (0)	4 (0)	1 (0)	8 (1)	4 (1)	4 (1)
	AG	159 (11)	108 (11)	51 (10)	108 (15)	58 (18)	50 (13)
	GG	1300 (89)	850 (88)	450 (90)	604 (84)	258 (81)	346 (87)
	FA	0.06	0.06	0.05	0.09 <sup>4</sup>	0.10 <sup>5</sup>	0.07 <sup>6</sup>
Alter (SD)		49 (10)	48 (10)	50 (9)	63 (9)	62 (9)	64 (9)
Alter bei Diagnose (SD)					46 (10)	45 (10)	47 (10)
BMI, kg / m <sup>2</sup> (SD)		26.9 (3.9)	27.0 (3.4)	26.3 (4.8)	28.9 (4.8)	28.4 (4.4) <sup>6</sup>	29.3 (5.0)
Nephropathy, n (%)					198 (31)	105 (36)	93 (28)
Hypertension, n (%)					464 (67)	181 (59)	283 (73)

Werte entsprechen n (%) für Allele und Diabetes-assoziierte Erkrankungen, und Mittelwerte (SD) für kontinuierliche Variablen. <sup>1</sup>,  $p < 0.02$  ( $\chi^2 = 8.1$ ) versus Kontrollfrauen; <sup>2</sup>,  $p < 0.001$  ( $\chi^2 = 14.4$ ) versus alle Kontrollen; <sup>3</sup>,  $p < 0.001$  ( $\chi^2 =$

20.0) versus Kontrollmänner; <sup>4</sup>,  $p < 0.005$  ( $\chi^2 = 12.9$ ) versus alle Kontrollen; <sup>5</sup>,  $p < 0.01$  ( $\chi^2 = 13.2$ ) versus Kontrollmänner; <sup>6</sup>,  $p = 0.14$  ( $\chi^2 = 3.1$ ) versus Kontrollfrauen.

Die folgenden Tabellen IIa und IIb zeigen das Risiko für Träger des GNB3-825T-Allels bzw. Träger des IRS1-3931A-Allels (einfache Effekte, Tabelle II.1) bzw. für Träger beider Allele (Kombinierte Effekte, Tabelle II.2), an Typ-2-Diabetes zu erkranken. Das Risiko ist hier als altersadjustierte Odds Ratio ausgedrückt, wobei die Odds Ratio für Fall-Kontroll-Studien etwa dem relativen Risiko bei prospektiven Studien entspricht.

Tabelle II: Odds Ratios für Diabetes für Träger des GNB3-T825-Allels, des IRS1-A-3931 Allels oder beider Allele

Dargestellt sind altersadjustierte Odds ratios.

### II.1 Einfache Effekte

Gene	Allele	Alle				Männer				Frauen			
		Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert
<b>GNB3</b>	TT/CC	116 / 763	61 / 314	1.25 (0.81-1.92)	0.3180	83 / 519	32 / 127	1.44 (0.83-2.51)	0.2002	33 / 244	29 / 187	1.22 (0.60-2.46)	0.5882
<b>GNB3</b>	TC/CC	585 / 763	345 / 314	1.48 (1.17-1.87)	0.0011	360 / 519	161 / 127	1.86 (1.35-2.57)	0.0002	225 / 244	184 / 187	1.12 (0.79-1.58)	0.5351
<b>GNB3</b>	TT + TC/CC	701 / 763	406 / 314	1.44 (1.15-1.80)	0.0015	443 / 519	193 / 127	1.78 (1.31-2.43)	0.003	258 / 244	213 / 187	1.13 (0.80-1.58)	0.4834
<b>IRS1</b>	AA/GG	5 / 1300	8 / 604	2.26 (0.53-9.59)	0.2686	4 / 850	4 / 285	1.71 (0.32-9.12)	0.5300	1 / 450	4 / 346	6.74 (0.42-109.57)	0.1797
<b>IRS1</b>	AG/GG	59 / 1300	108 / 604	1.35 (0.97-1.89)	0.0802	108 / 850	58 / 258	1.76 (1.14-2.69)	0.0100	51 / 450	50 / 346	0.99 (0.57-1.72)	0.9762
<b>IRS1</b>	AA + AG/GG	164 / 1300	116 / 604	1.38 (1.00-1.92)	0.0531	112 / 850	62 / 258	1.75 (1.15-2.67)	0.0086	52 / 450	54 / 346	1.07 (0.62-1.83)	0.8122

Tabelle II: Odds Ratios für Diabetes für Träger des GNB3-T825-Allels, des IRS1-A-3931 Allels oder beider Allele

Dargestellt sind altersadjustierte Odds ratios.

## II.2 Kombinierte Effekte

		Alle					Männer					Frauen				
Gene	Allele	Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert			
GNB3 (IRS1 GG)	TT / CC	106 / 684	50 / 264	1.13 (0.70-1.81)	0.6156	75 / 461	25 / 104	1.31 (0.71-2.42)	0.3926	31 / 223	25 / 160	1.09 (0.52-2.32)	0.8157			
GNB3 (IRS1 GG)	TC / CC	510 / 684	290 / 264	1.53 (1.19-1.96)	0.0010	314 / 461	129 / 104	1.90 (1.33-2.70)	0.0004	196 / 223	161 / 160	1.19 (0.82-1.72)	0.3600			
GNB3 (IRS1 GG)	TT+TC/ CC	616 / 684	340 / 264	1.46 (1.15-1.86)	0.0022	389 / 461	154 / 104	1.78 (1.27-2.50)	0.0008	227 / 223	186 / 160	1.18 (0.82-1.68)	0.3743			
IRS1 (GNB3 CC)	AA + AG / GG	79 / 684	50 / 264	1.48 (0.90-2.43)	0.1198	58 / 461	23 / 104	1.78 (0.93-3.38)	0.0782	21 / 223	27 / 160	1.33 (0.59-3.00)	0.4984			
IRS1 + GNB3	TT + AA or AG/ CC + GG	10 / 684	11 / 264	3.38 (1.13-10.08)	0.0291	8 / 461	7 / 104	4.03 (1.12-14.56)	0.0333	2 / 223	4 / 160	3.39 (0.49-31.60)	0.1975			
IRS1 + (GNB3 )	TC + AA or AG / CC + GG	75 / 684	55 / 264	1.69 (1.05-2.73)	0.0311	43 / 461	32 / 104	2.82 (1.52-5.23)	0.0010	28 / 223	23 / 160	0.89 (0.41-1.93)	0.7706			
IRS1 + GNB3	TC or TT + AA or AG / CC + GG	85 / 684	66 / 264	1.87 (1.19-2.92)	0.0062	54 / 461	39 / 104	2.99 (1.69-5.30)	0.0002	31 / 223	27 / 160	1.05 (0.51-2.17)	0.8959			

Man erkennt eine deutliche Risikosteigerung für den Typ-2-Diabetes für Träger des GNB3-825T-Allels bzw. Träger des IRS1-3931A-Allels (Tabellen II.1 und II.2). Eine drastische Risikosteigerung findet man bei Individuen, bei denen beide Gene verändert sind. Somit kann der Nachweis des GNB3-825T-Allels dazu dienen, bei den betroffenen Personen die Neigung für eine Erkrankung an Typ-2-Diabetes festzustellen bzw. eine genetisch bedingte Ursache einer bereits aufgetretenen Erkrankung zu ermitteln.

## 2. Vorhersage von Adipositas/Übergewicht

Die Regulation des Body Mass Index (BMI), ein Maß für das Verhältnis von Körpergewicht zu Körpergröße, wird durch viele Gene bestimmt. Übergewicht ist zu etwa 40% genetisch bedingt, wird aber auch durch überhöhte Kalorienzufuhr bei bestehendem Bewegungsmangel verursacht. Die G $\beta$ 3-s Spleißvariante ist mit dem zellulären Phänotyp eines gesteigerten Zellwachstums verbunden. Damit ist es auch möglich, daß das GNB3-825T-Allel zu einem gesteigerten Körperwachstum, u.a. Übergewicht, prädisponiert, und epi- und hypostatische Effekte ausüben kann. Dabei kann ebenso wie beim Diabetes mellitus (Typ 2) ein Zusammenhang bestehen mit Veränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im Gen, das für den  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg-Variante) und im Gen, das für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor kodiert, hier insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante.

Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigten, daß das Fehlen des Gens, welches für das IRS-1-Protein kodiert, im Gegensatz dazu zu einer starken Verzögerung des Körperwachstums führt (Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., Sekihara, H., Yoshioka, S., Horikoshi, H., Furuta, Y., Ikawa, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., and Aizawa, S. Insulin resistance

and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372:182-186, 1994).

Um die Korrelation von Adipositas mit dem Vorliegen des GNB3-825-Nukleotids und der Status des IRS1-Gens bezüglich des Vorliegens der Gly971Arg-Variante zu überprüfen, wurde der BMI bei 20-30-jährigen gesunden Männern, bei denen gleichzeitig der Status des GNB3-825-Nukleotids und der Status des IRS1-Gens bezüglich des Vorliegens der Gly971Arg-Variante untersucht wurde, gemessen. Das Ergebnis ist in Figur 3 dargestellt.

Fig. 3 zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Werte für den BMI. Bei Vorliegen des häufigeren IRS1-"GG"-Genotyps läßt sich mit dem GNB3-825T-Allel im Vergleich zum GNB3-C825-Allel eine signifikante Tendenz zu erhöhtem BMI nachweisen. Die Odds Ratio für das 75%-Quartil gegenüber dem 25 % Quartil beträgt 2,5. Dagegen wird der Neigung zu gesteigertem BMI bei Trägern des GNB3-825T-Allels bei gleichzeitiger Anwesenheit des IRS1-3931A-Allels (Gly971Arg-Variante) deutlich entgegengewirkt. Dies illustriert den interaktiven Effekt von GNB3 und IRS1 auf den BMI. Somit läßt sich das Vorliegen des GNB3-825T-Allel zuverlässig mit Adipositas korrelieren. Damit ist es möglich, eine Neigung zu Adipositas bei Trägern dieses Allels, insbesondere solchen, denen gleichzeitig das IRS1-3931A-Allel (Gly971Arg-Variante) fehlt, vorherzusagen.

### 3. Vorhersage von koronarer Herzkrankheit und Atherosklerose

Es ist bereits bekannt, daß koronare Herzkrankheit mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sein können. Um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit und dem Vorhandensein des GNB3-825T-Allels zu überprüfen, wurden Patienten mit angiographisch ausgeschlossener koronarer Herzkrankheit, mit koronarer Herzkrankheit (ohne Myokardinfarkt), mit einem Myokardinfarkt und mit mehr als einem Myokardinfarkt auf das Vorhandensein dieses Alles überprüft. Das Ergebnis ist in Fig. 4 dargestellt.

Fig. 4 zeigt die Frequenz des GNB3-825T-Allels bei Patienten mit angiographisch ausgeschlossener koronarer Herzkrankheit (KHK), mit KHK (ohne Myokardinfarkt; MI), mit einem Myokardinfarkt (MI) und mit mehr als einem Myokardinfarkt.

Man erkennt einen deutlichen Anstieg der Frequenz des GNB3-825T-Allels bei KHK und MI. Das Risiko für KHK und MI wird durch das GNB3-825T-Allel gegenüber Kontrollen ohne KHK etwa verdoppelt.

Patienten mit Mutation im IRS-1 Protein (3931A-Allel; Gly971Arg-Variante) erfahren jedoch eine deutliche Risikoreduktion um bis zu 50 % bei Vorliegen des GNB3-C825- oder des GNB3-825T-Allels. Diese Veränderung im IRS-1-Protein übt also hypostatische Effekte aus, d.h. diese Variante schützt vor koronarer Herzkrankheit.

Vergleicht man Patienten mit KHK mit Individuen mit koronarangiographisch ausgeschlossener KHK, so ergeben sich die folgenden Odds Ratios:

KHK positiv	KHK negativ	OR	P - Wert
GNB3 + IRS1-Status	GNB3 + IRS1-Status		
TT/TC + AG/AA	TT/TC + GG	0.94	Nicht signifikant
TT/TC + GG	CC + GG	1,4	0,003
TT/TC + GG	CC + AG/AA	2,8	0,002

Damit ist eine Korrelation zwischen dem Vorliegen des GNB3-825T-Allels mit dem Auftreten koronarer Herzkrankheit belegt. Somit ist es möglich, eine Neigung zu koronarer Herzkrankheit bei Trägern dieses Allels, insbesondere solchen, denen gleichzeitig das IRS1-3931A-Allel (Gly971Arg-Variante) fehlt, vorherzusagen.

Ein besonderer Anwendungsbereich ist die Vorhersage einer koronaren Herzkrankheit, aber auch allgemein des kardiovaskulären Risikos (Bluthochdruck, usw.) bei Frauen, mit dem Ziel, diese einer gezielten, post-menopausalen



Hormontherapie mit weiblichen Sexualhormonen zuzuführen, um das kardiovaskuläre Risiko zu vermindern.

Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Vorhersage eines erhöhten Risikos für Myokardinfarkte und plötzlichen Herztod. Dies hängt u.a. damit zusammen, daß G-Proteine auch Ionenkanäle steuern. Genauer gesagt, steuern die  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen die Funktion vielfältiger Ionenkanäle, z.B. von  $Na^+$ -Kanälen,  $Ca^{2+}$ -Kanälen und  $K^+$ -Kanälen. Eine genau abgestimmte Regulation solcher Ionenkanäle ist für alle elektrisch erregbaren Gewebe von großer Wichtigkeit, insbesondere für das Herz (De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A., and Campbell, K.P. Direct binding of G-protein  $\beta\gamma$  complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385(6615):446-450, 1997; Ma, J.Y., Catterall, W.A., and Scheuer, T. Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Neuron* 19(2):443-452, 1997; Kofuji, P., Davidson, N., and Lester, H.A. Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  channels are activated by  $G\beta\gamma$  subunits and function as heteromultimers. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:6542-6546, 1995; Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D.E.  $G\beta\gamma$  binds directly to the G protein-gated  $K^+$  channel,  $I_{KACH}$ . *J.Biol.Chem.* 270:29059-29062, 1995).

Es hat sich gezeigt, daß Personen, die das GNB3-T825-Allel tragen, eine verstärkte Aktivität myokardialer  $K^+$ - Kanäle zeigen. Dies führt zu einer beschleunigten Repolarisation der Herzmuskelzelle, und damit zu einer verkürzten Refraktärzeit. Diese Personen unterliegen damit einem erhöhten Risiko für Herzrhythmusstörungen, insbesondere ventrikuläre Tachykardien, Extrasystolen, Kammerflattern und Kammerflimmern. Sie tragen ein verstärktes Risiko für einen plötzlichen Herztod auch im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts.

Schließlich zeigen Träger des GNB3-825T-Allels bereits im Alter von 20 - 30 Jahren deutliche Veränderungen der Eigenschaften von Blutgefäßen. Besonders auffällig sind eine erhöhte Pulswellengeschwindigkeit, ein gesteigertes Schlagvolumen des Herzens und ein erhöhter Pulsdruck. Diese Phänomene sind Ausdruck einer früh einsetzenden Neigung zu einer erhöhten Steife der Blutgefäße (verminderte Compliance) als Indikator für eine Atherosklerose. Die Genotypisierung zur Feststellung des GNB3-C825T-Allelstatus ist damit geeignet, ein erhöhtes Risiko für die Atherosklerose festzustellen.

#### 4. Vorhersage einer verstärkten Funktion des Immunsystems

G-Proteine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren finden sich auch in allen Zellen des Immunsystems, insbesondere auch in Leukozyten. Chemotaxis von Zellen wird vorwiegend durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine vermittelt. Damit sollte auch das GNB3-825T-Allel zu einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystems, insbesondere zu einer verstärkten Immunabwehr führen.

In der Tat weisen neutrophile Granulozyten von Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte Chemotaxis gegenüber dem Peptid fMLP auf (Fig.5). fMLP ist ein Peptid, welches für eine Vielzahl von bakteriellen Peptiden repräsentativ ist und chemotaktische Reaktionen stimuliert. Es dient daher als Testsystem für die Messung chemotaktischer Reaktionen von Zellen, welches dem Fachmann wohlbekannt ist. Der fMLP-Rezeptor aktiviert bekanntlich Pertussistoxin-sensitive G-Proteine. Die Feststellung, daß Granulozyten von Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte fMLP-stimulierte Chemotaxis zeigen, steht in Einklang mit der Tatsache, daß die Chemotaxis von heterodimeren  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt wird.

Dieses Phänomen läßt sich auch in anderen Leukozyten, z.B. Lymphozyten, nachweisen. Somit besteht eine Korrelation zwischen dem GNB3-825T-Allel und einer gesteigerten Chemotaxis

von Zellen des Immunsystems, z.B. von neutrophilen Granulozyten, T- Lymphozyten oder B-Lymphozyten.

Ferner beobachtet man bei Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte Proliferationsneigung von Zellen des Immunsystems, besonders auch nach Impfungen.

Gesunde Träger des GNB3-825T-Allels zeigen eine erhöhte Anzahl von Leukozyten und von CD4-positiven T-Lymphozyten (absolut und prozentual) mit gesteigertem CD4/CD8 - Quotienten. Fig.6 zeigt dies für die erhöhte Zahl von CD4 - Lymphozyten. Dies läßt sich auch bei AIDS-Patienten nachweisen, bei denen die CD4-Zahl die Schwere der Erkrankung bzw. die voraussichtliche Lebensdauer anzeigt (Fig.7). Damit einher geht eine verstärkte Neigung, trotz HIV-Infektion eine erhöhte Anzahl an CD4- positiven T-Lymphozyten beizubehalten. Träger des GNB3-825T-Allels zeigen auch eine verstärkte Neigung, nach einer HIV-Infektion an AIDS zu erkranken, auch im Zusammenhang mit dem Nachweis der oben beschriebenen Genveränderung in Chemokinrezeptoren, insbesondere einer  $\Delta 32$ - Deletion im CCR5- Rezeptor oder im Bereich des Promotors dieses Gens.

Schließlich beobachtet man bei betroffenen Personen eine verstärkte Freisetzung von immunmodulatorischen Substanzen, Hormonen und anderen Substanzen aus Leukozyten (Zytokine, Interleukine, Wachstumsfaktoren, Antikörper, gefäßwirksame Substanzen). In diesem Zusammenhang resultiert auch eine verstärkte Immunabwehr nach Transplantation von Organen oder Geweben (Niere, Herz, Knochenmark, Lunge, Haut, Leber etc.) mit der Gefahr der Transplantatabstossung. Außerdem folgt daraus eine verstärkte Neigung zu Autoimmunerkrankungen (Rheuma, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) und zu allergischen Erkrankungen, z.B. der Haut, der Atemwege oder anderer Organe (z.B. Neurodermitis, Heuschnupfen, Asthma bronchiale). Dies beobachtet man auch in Kombination mit dem Nachweis anderer Genveränderungen, z.B. im  $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor, hier insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante.

## 5. Vorhersage einer erhöhten CO<sub>2</sub>- bzw. Hypoxietoleranz

Bekanntlich sind G-Proteine auch an der Regulation des Atemantriebs durch Hypoxie bzw. Hyperkapnie beteiligt (Prabhakar, N.R., Kou, Y.R., and Kumar, G.K. G proteins in carotid body chemoreception. Biol.Signals 4:271-276, 1995; Cachero, T.G., Rocher, A., Rigual, R.J., and Gonzalez, C. Effects of fluoride and cholera and pertussis toxins on sensory transduction in the carotid body. Am.J.Physiol.Cell Physiol. 269:C1271-C1279, 1995).

Es hat sich herausgestellt, daß Probanden, die das GNB3-825T-Allel tragen, einen verminderten Antrieb der Atmung (Atemminutenvolumen) bei Erhöhung des inspiratorischen pCO<sub>2</sub> und damit eine gesteigerte CO<sub>2</sub>-Toleranz zeigen. Eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Toleranz stellt insbesondere für solche Personen ein erhöhtes Risiko dar, in deren Arbeitsumgebung es zu einer CO<sub>2</sub>-Akkumulation kommen kann. Die verminderte CO<sub>2</sub>-Sensitivität beinhaltet dabei ein erhöhtes Risiko für eine spontan auftretende Bewußtlosigkeit, z.B. im Rahmen des narkotischen Effekts von CO<sub>2</sub>. Betroffen hiervon sind z.B. Berufstaucher, Tunnelarbeiter, Piloten, U- Boot-Fahrer usw. Mit dem Nachweis des GNB3-825T-Allels können solche Personen identifiziert und gewarnt werden, so daß das Unfallrisiko vermindert wird.

## 6. Vorhersage von Osteoporose

Eine generalisierte Osteoporose stellt eine der häufigsten Erkrankungen von Frauen nach der Menopause dar und beinhaltet ein erhöhtes Risiko für Knochenfrakturen. G-Proteine sind an Prozessen, die zum Umbau des Knochens führen, maßgeblich beteiligt. Eine veränderte Aktivierbarkeit von G- Proteinen ist damit erheblich am Erkrankungsrisiko für Osteoporose beteiligt (May, L.G. and Gay, C.V. Multiple G-protein involvement in parathyroid hormone regulation of acid production by osteoclasts. J.Cell Biochem. 64(1):161-170, 1997; Gordeladze,

J.O., Lund, H.W., Jablonski, G., and Bruland, O.S. Diverse expression of G-proteins in human sarcoma cell lines with different osteogenic potential: Evidence for the involvement of  $G_{i2}$  in cell proliferation. J.Cell.Biochem. 60:95-106, 1996).

Auch in diesem Fall zeigen Trägerinnen des GNB3-825T-Allels ein erhöhtes Risiko, an Osteoporose zu erkranken.

## 7. Vorhersage von Morbus Alzheimer

Eine geänderte Aktivierbarkeit von G-Proteinen und eine veränderte Regulation von  $K^+$ -Kanälen wurde bei Patienten mit Morbus Alzheimer beschrieben. Ferner wurde eine verminderte Aktivierung der Adenylylcyclase nach Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren beschrieben. Diese Phänomene können auf eine erhöhte Aktivierbarkeit Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine mit Expression der  $G\beta 3s$ -Spleißvariante zurückgeführt werden (Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., and Nishimoto, I. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. J.Biol.Chem. 270:4205-4208, 1995; Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y., and Ogata, E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein  $G_0$ . Nature 362:75-79, 1993; Etcheberrigaray, R., Ito, E., Oka, K., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., and Alkon, D.L. Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8209-8213, 1993; Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Takeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T.B., Giambarella, U., and Nishimoto, I. G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. Science 272:1349-1352, 1996; Cowburn, R.F., Wiehager, B., Ravid, R., and Winblad, B. Acetylcholine muscarinic M2 receptor stimulated [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding shows regional selective changes in

Alzheimer's disease postmortem brain. Neurodegeneration 5:19-26, 1996).

Demzufolge weisen Träger des GNB3-825T-Allels ein erhöhtes Risiko auf, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Zudem trägt die bei Trägern des GNB3-825T-Allels zu beobachtende früh einsetzende unter 3. beschriebene Atherosklerose zur Entstehung des Morbus Alzheimer bei.

#### 8. Vorhersage einer sexuellen Dysfunktion

Aufgrund der Neigung zu vermehrten atherosklerotischem Gefäßumbau bei Trägern des 825T-Allels, erhöht sich bei Männern das Risiko für eine erektile Dysfunktion und organisch bedingte Impotenz. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die vermehrte Atherosklerose zu einer Verminderung des für eine Erektion erforderlichen, vermehrten Bluteinstroms in die Schwellkörper des Penis führt. Bei Frauen kann das Vorhandensein eines 825T-Allels in analoger Weise zu einer verminderten Durchblutung der Sexualorgane (z.B. der Klitoris) und damit zu einer verminderten sexuellen Stimulierbarkeit und Orgasmusfähigkeit führen.

#### 9. Vorhersage von Schilddrüsenfunktionsstörungen

Träger des 825T-Allels weisen häufig eine gestörte Schilddrüsenfunktion auf und müssen mit Schilddrüsenhormonen (z. B. Thyroxin) behandelt werden.

#### 10. Vorhersage eines erhöhten Schwangerschaftsrisikos

Hochdruck, Ödembildung und das sog. „HELLP-Syndrom“ bedeuten eine schwerwiegende Gefahr für die Schwangerschaft, sowohl für das Leben der Mutter als auch für das Leben des ungeborenen Kindes. Es wurde gefunden, daß bei Trägerinnen des 825T-Allels, die einen Schwangerschaftshochdruck entwickeln (Gestose, Präeklampsie) ein hohes Risiko für eine Frühgeburt (Geburt vor

der 37. Schwangerschaftswoche oder Geburtsgewicht des Kindes kleiner als 2500g) besteht, wobei für diese Kinder zusätzlich das Risiko für eine Totgeburt oder für einen Tod nach der Entbindung besteht. Gleichzeitig erhöht sich bei Frauen, die Trägerinnen des 825T-Allels sind und unter Schwangerschaftsgestose leiden, das Risiko für spontane Aborte (habituelle Aborte).

Der Nachweis eines 825T-Allels ist daher geeignet, ein erhöhtes Todesrisiko für das ungeborene Kind von Schwangeren mit Schwangerschaftsgestose vorherzusagen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Pharmakogenetik des GNB3-825T-Allels, d.h. die Möglichkeit, anhand des Genotyps die Wirkung von Pharmaka vorherzusagen.

Die meisten Pharmaka (Hormone, Rezeptoragonisten) üben ihre Wirkung über Rezeptoren aus, die an G-Proteine koppeln. Antagonisten blockieren die Hormon- Rezeptor- Interaktion.

Es hat sich nun herausgestellt, da die Genotypisierung am GNB3-Lokus dazu geeignet ist, die Wirksamkeit von Pharmaka anhand des Genotyps vorherzusagen. Dies betrifft die Ansprechbarkeit in vivo auf Hormone, Transmitter (auch Neurotransmitter) oder Pharmaka, die solche G-Protein-Heterotrimere aktivieren, welche die G-Protein-Untereinheiten  $G\beta_3$  und  $G\beta_3s$  beinhalten. Damit einher geht die Vorhersage einer verminderten Wirksamkeit von Hormonen, Neurotransmittern oder Pharmaka, welche die G-Protein-Untereinheit  $G\alpha_s$  stimulieren, z.B.  $\beta$ -adrenerge Agonisten. Dies gilt auch bei gleichzeitiger Verwendung des Nachweises der Arg16Gly-Variante und der Gln27Glu-Variante im  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor. Das Vorhandensein des GNB3-825T-Allels zeigt also eine veränderte Pharmakogenetik an und sollte bei der spezifischen Auswahl einer Therapieform (pharmakologisch oder nicht- pharmakologisch ) und bei der Dosierung von Pharmaka oder Hormonen bei Hypertonie, Diabetes mellitus,

koronarer Herzkrankheit, akutem Myokardinfarkt mit oder ohne Herzrhythmusstörungen, Herzrhythmusstörungen, Transplantatabstossung etc. berücksichtigt werden.

Im diesem Zusammenhang erlaubt das Vorhandensein des GNB3-825T-Allels aber auch die Vorhersage der Wirksamkeit der Gabe von Erythropoetin auf die Blutbildung und Vorhersage der Entstehung einer Hypertonie unter dieser Therapie sowie die Vorhersage der Gefahr, unter immunsuppressiver Therapie (z.B. mit Cyclosporin) eine Hypertonie zu entwickeln.

Ebenfalls in diesem Zusammenhang kann die Wirksamkeit von Substanzen zu Therapie und Prophylaxe des Migräneanfalls (Agonisten am Serotonin-Rezeptor) vorhergesagt werden.

Dies wird anhand des folgenden Beispiels demonstriert. Hierbei wurde bei Probanden intrakoronar ein  $\alpha_2$ -adrenerger Agonist (BHT 933) appliziert, der zur Kontraktion von Koronargefäßen führt. Dieser Effekt wurde über die Flußänderung durch diese Gefäßabschnitte quantifiziert. Wie Fig. 8 zeigt, beobachtet man eine verstärkte Abnahme der Koronardurchblutung bei Trägern des GNB3-825T-Allels, unabhängig davon, ob sie an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) erkrankt sind. Das heißt, daß bei Trägern des GNB3-825T-Allels eine Verstärkung der Wirkung solcher Pharmaka vorauszusagen ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Herstellung von Pharmaka, welche die  $G\beta_3s$  - Spleißvariante hemmen.

Prinzipiell ist es möglich, Chemikalien zu synthetisieren, welche die Funktion des  $G\beta_3s$  - Proteins hemmen, indem diese z.B. zu einem beschleunigten Abbau des Proteins führen, oder seine Interaktion und Kombination mit  $\alpha$ - und  $\gamma$ - Untereinheiten des humanen G-Proteins hemmen. Zur Identifizierung solcher Substanzen ist ein Screeningsystem erforderlich. Hierzu eignet



sich die Expression der G $\beta$ 3s-Untereinheit alleine oder in Kombination mit unterschiedlichen G $\alpha$ - und G $\gamma$ -Untereinheiten in Sf9-Insektenzellen, in anderen zur Transfektion geeigneten Zellen, oder die Verwendung gereinigter G $\alpha$ - und G $\gamma$ 3s - Untereinheiten in einem Rekonstitutionssystem in Ab- oder Anwesenheit eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Mittels solcher Systeme läßt sich z.B. die Wirkung von Chemikalien auf die Rezeptor- vermittelte Bindung von GTP an die G $\alpha$ - Untereinheit untersuchen, wodurch letztendlich Chemikalien identifiziert werden können, welche die Funktion der G $\beta$ 3s- Untereinheit hemmen. Ein solches Testsystem kann prinzipiell auch als "High-Throughput-Screening-System" zur Testung einer Vielzahl von Substanzen eingesetzt werden.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuresequenz codierend für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins mit der in Anhang 1 dargestellten Sequenz.
2. Nukleinsäuresequenz codierend für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins mit der in Anhang 2 dargestellten Sequenz.
3. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanes G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Ermittlung des Risikos, an einer mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheit zu erkranken.
4. Verwendung nach Anspruch 3 zur Ermittlung des Risikos, an Diabetes mellitus Typ 2, Übergewicht und Adipositas, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, plötzlichem Herztod, Osteoporose, Atherosklerose, neurodegenerativen oder cerebrovaskulären Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer und/oder einer Krankheit, die auf einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystem beruht, zu erkranken.
5. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Vorhersage des Risikos von Frauen, an einer kardiovaskulären Erkrankung, insbesondere Bluthochdruck oder koronare Herzkrankheit zu erkranken und zur

Erstellung einer gezielten Hormontherapie um das kardiovaskuläre Risiko zu vermindern.

6. Verfahren zur Ermittlung des Risikos eines Probanden, an einer mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheit zu erkranken, bei dem die Gensequenz für die G $\beta$ 3-Untereinheit des humanen G-Proteins des Probanden mit der Gensequenz in Anlage 1 und/oder Anlage 2 vergleicht und für den Fall, daß sie mit der Gensequenz in Anlage 2 in Position 825 und/oder in Position 1429 übereinstimmt, dem Probanden ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im IRS2-Gen, im Gen, das für die p85 $\alpha$ -regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase kodiert (1020 G  $\rightarrow$  A; Kodon 326 Met  $\rightarrow$  Ile), im Gen, das für den  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg), im Gen, das für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor kodiert (hier insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante), im Gen, das für Tumornekrosefaktor  $\alpha$  kodiert und/oder im Gen, das für Leptin oder den Leptinrezeptor kodiert, untersucht werden.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Übergewicht und Adipositas zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im Gen, das für den  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg-Variante) und/oder im Gen, das für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor kodiert, (insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante) untersucht werden.

9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an koronarer Herzkrankheit und/oder Myokardinfarkt zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg) untersucht werden.

10. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Krankheiten, die mit einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystems assoziiert sind, zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen, im  $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor, (insbesondere die Arg16Gly- Variante und die Gln27Glu-Variante) untersucht werden.

11. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G $\beta 3$ -Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Identifizierung von Personen mit erhöhter CO<sub>2</sub>- bzw. Hypoxietoleranz.

12. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G $\beta 3$ -Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Vorhersage der Ansprechbarkeit eines Probanden in vivo auf Hormone, Transmitter (auch Neurotransmitter) oder Pharmaka, die solche G-Protein-Heterotrimere aktivieren, welche die G-Protein-Untereinheiten G $\beta 3$  und G $\beta 3s$  beinhalten und/oder die G-Protein-Untereinheit G $\alpha s$  stimulieren.

13. Verwendung nach Anspruch 12 zur Vorhersage der Ansprechbarkeit eines Probanden, wobei gleichzeitig die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante im  $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor nachgewiesen wird.

14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13 zur spezifischen Auswahl einer pharmakologischen oder nicht-pharmakologisch Therapieform bzw. der Dosierung von Pharmaka oder Hormonen bei Hypertonie, Diabetes mellitus, koronarer Herzkrankheit, akutem

Myokardinfarkt mit oder ohne Herzrhythmusstörungen,  
Herzrhythmusstörungen und Transplantatabstossung.

15. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, zur Vorhersage der Wirksamkeit der Gabe von Erythropoetin auf die Blutbildung und/oder Vorhersage der Entstehung einer Hypertonie unter dieser Therapie.

16. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, zur Vorhersage der Gefahr, unter immunsuppressiver Therapie, insbesondere mit Cyclosporin, eine Hypertonie zu entwickeln.

17. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13 zur Vorhersage der Wirksamkeit von Substanzen zu Therapie und Prophylaxe des Migräneanfalls.

19. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die komplementär zu der Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 ist, zur Herstellung eines Antisense-Arzneimittels zur Therapie oder Prävention von Krankheiten.

20. Verwendung des Proteins der G $\beta$ 3s-Untereinheit des humanen G-Proteins in rekombinierten Systemen oder nach Transfektion in geeigneten Zelllinien zur Identifizierung von Chemikalien, welche die Funktion von G $\beta$ 3s hemmen.

Fig.1:

Expression von G $\beta$ 3 und G $\beta$ 3-s in COS-7 - Zellen. Die Aktivierbarkeit von G-Proteinen wird über den Einbau von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S quantifiziert. Die G-Proteine werden dabei durch das Peptid Mastoparan-7 (Mas-7) stimuliert.

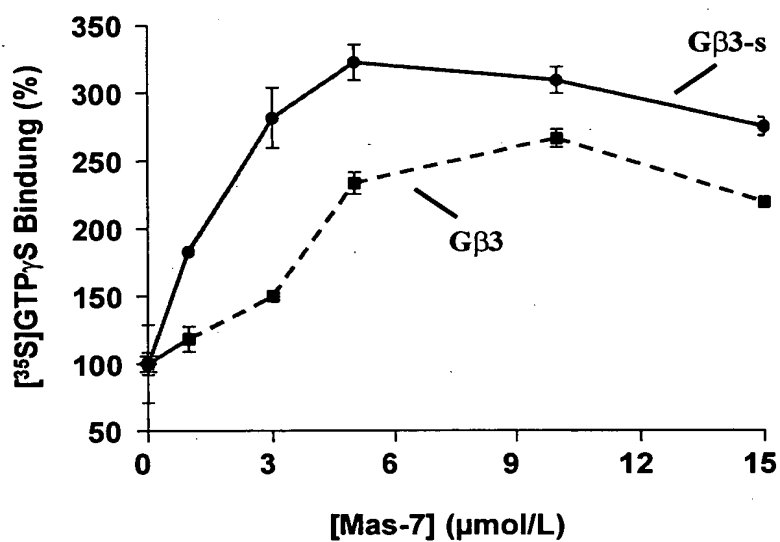


Fig.2:

Expression von  $G\beta 3$  und  $G\beta 3-s$  in Sf9 - Insektenzellen, bei gleichzeitiger Expression von  $G\alpha i 3$ ,  $G\gamma 5$  und des m2-muskarinergen Rezeptors. Die Aktivierbarkeit von G-Proteinen wird über den Einbau von  $[35S]GTP\gamma S$  quantifiziert. Die G-Proteine werden dabei durch Carbachol stimuliert.

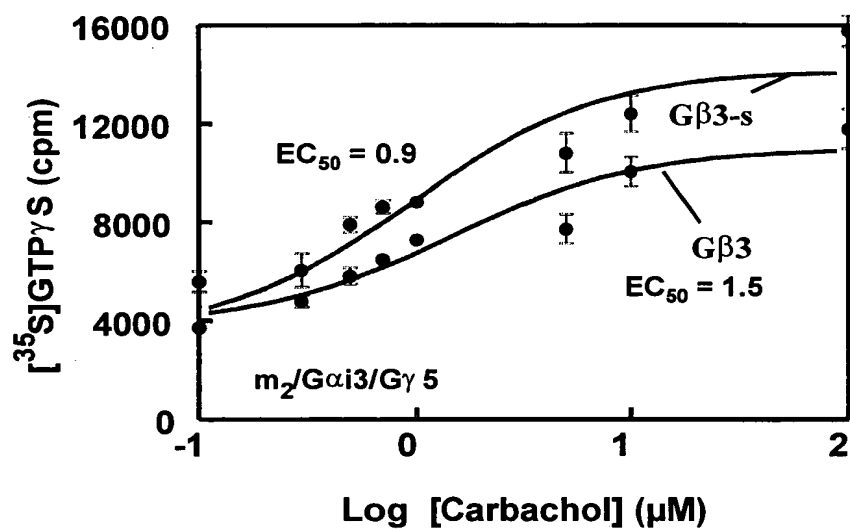


Fig. 3:

Verteilung des Body Mass Index bei 20-30 jährigen Männern in Abhängigkeit vom GNB3 und IRS1 - Genotyp. Individuen mit IRS1 GG-Genotyp, die das GNB3 825T-Allel tragen, weisen einen erhöhten BMI auf. Diesem Effekt wird durch das IRS1 3931A-Allel entgegengewirkt.

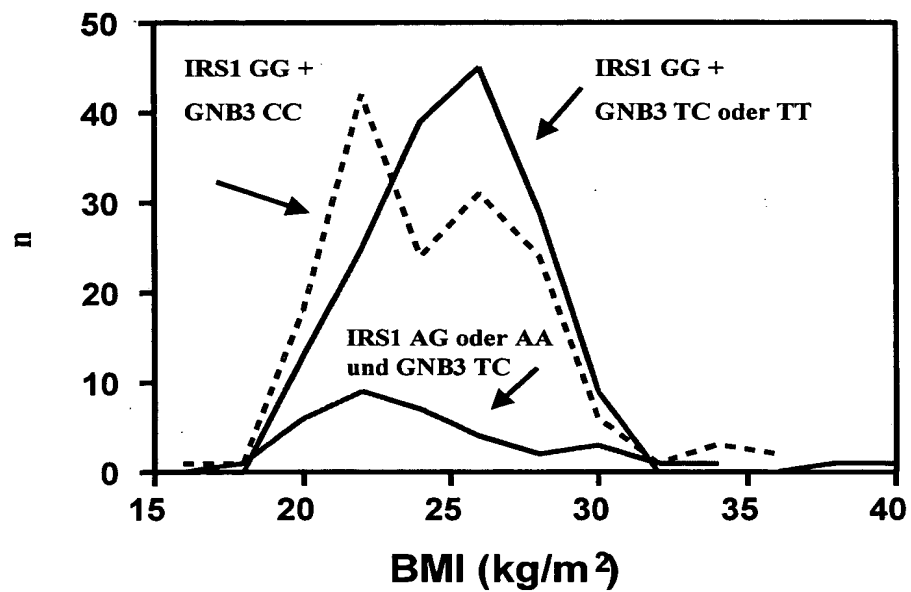




Fig.4:

Frequenz des GNB3 825 T -Allels bei koronarer Herzkrankheit (KHK) und Myokardinfarkt.

Keine KHK = angiographisch ausgeschlossen kHK

KHK = koronare Herzkrankheit ohne Myokardinfarkt

MI = koronare Herzkrankheit und früherer Myokardinfarkt

MI > 1: koronare Herzkrankheit und mehr als ein anamnestischer Myokardinfarkt

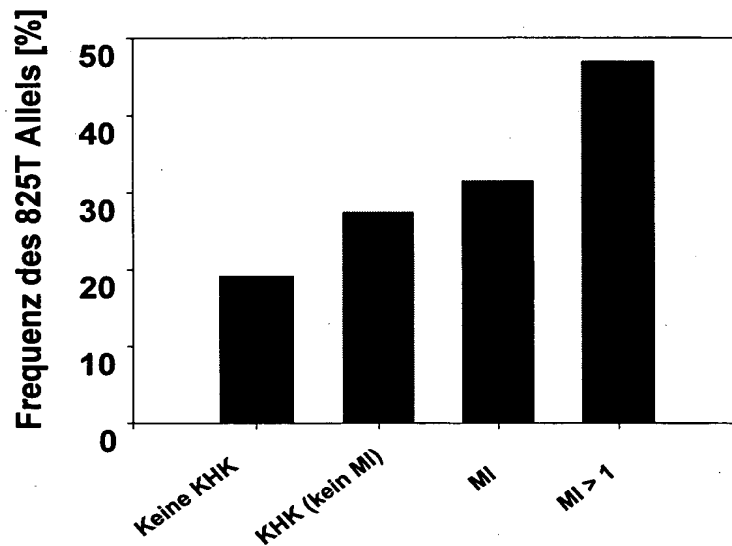


Fig.5:

fMLP - stimulierte Chemotaxis bei menschlichen neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit vom GNB3 Genotyp.

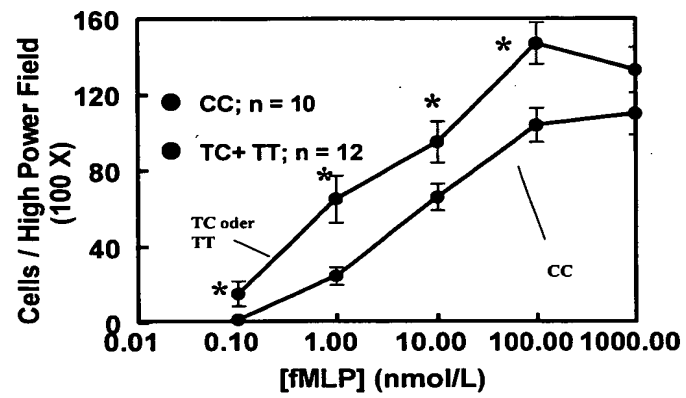


Fig.6:

CD 4 Count (Zahl der CD4-positiven T-Lymphozyten /  $\mu$ l)  
bei männlichen, gesunden Blutspendern (Nichtraucher) in  
Abhängigkeit vom GNB3 - Genotyp.

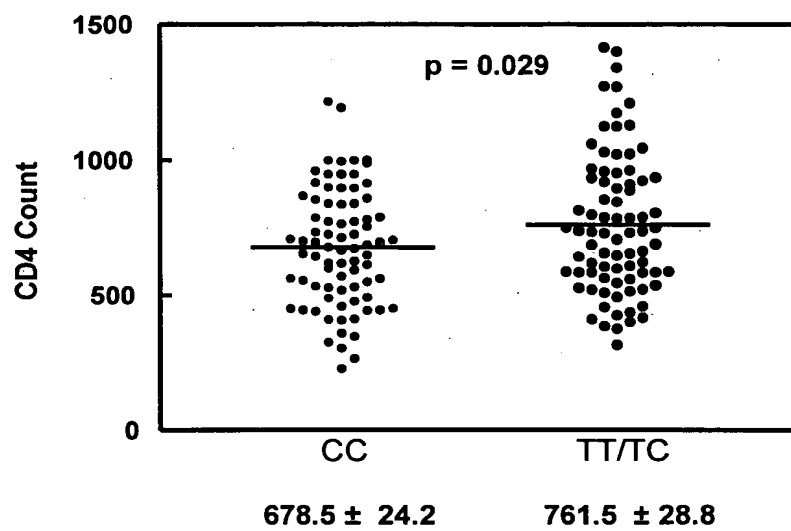


Fig.7:

CD 4 Count (Zahl der CD4-positiven T-Lymphozyten /  $\mu$ l)  
bei männlichen AIDS-Patienten in Abhängigkeit vom GNB3 -  
Genotyp.

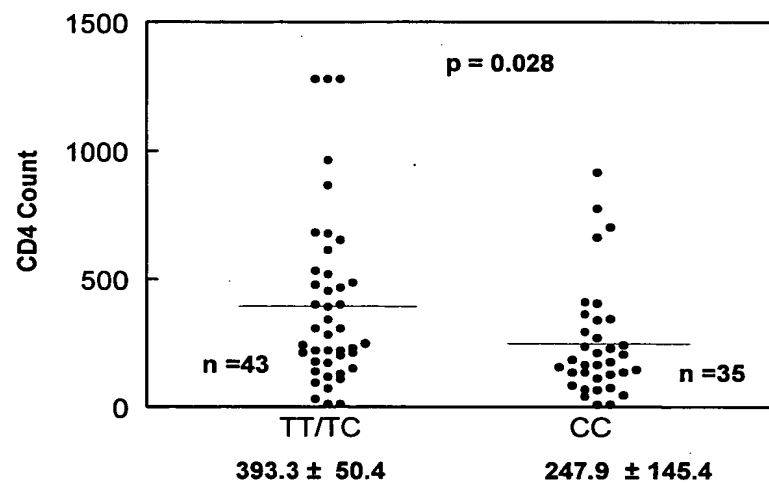
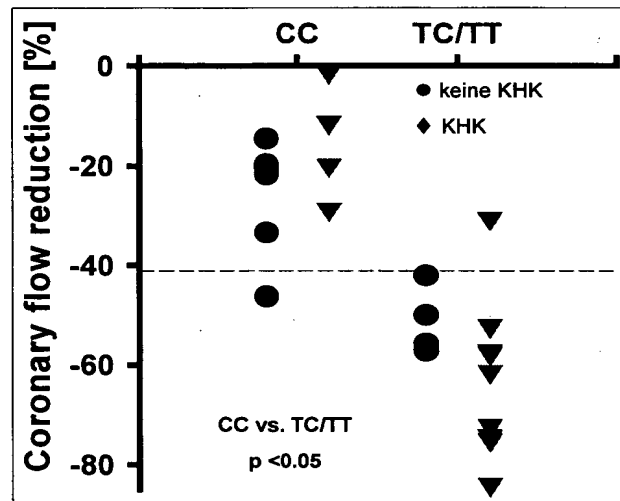


Abb 8:

Wirkung einer intrakoronaren Applikation des A2-adrenergen Agonisten BHT 933 auf die Koronardurchblutung in Abhängigkeit vom GNB3 Genotyp.



Anlage: Lokalisation des Polymorphismus in cDNA

Anlage 1:  $\beta$ 3-Originalsequenz von Levine

Die Exons sind wechselweise unterstrichen.  
Der Bereich, der durch kryptisches Splicen wegfällt,  
ist fettgedruckt.

1 gggtcga**ATGG** GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT  
Start-ATG EXON 3 nach Ansari-Lari  
Nucleotide 1-6 scheinen nicht zuzutreffen

61 GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTG TGGCCTAGAG  
/Beginn EXON 4 /EXON 5 Beginn  
==> ENDE 1 KOLON ANSARI

121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT  
EXON 5

181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG  
EXON 5 / Beginn EXON 6

241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCCTC GCGCTCCTCC  
EXON 6 / EXON 7

301 TGGGTCTATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC  
EXON 7

361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG  
EXON 7

421 CTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG  
EXON 7 /EXON 8

481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATTG AGACTGGGCA GCAGAAGACT  
EXON 8 /EXON 9

kryptisches SPLICING

541 GTATTGTGG GACACACGGG TGA**CTGCATG** AGCCTGGCTG TGTCTCCTGA CTTC**AACTCTC**  
EXON 9  
kryptisches SPLICING

601 TT**CATTTCGG** GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC  
EXON 9  
kryptisches SPLICING /

661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCCAATGGA  
EXON 9 / Beginn EXON 10

721 GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGT**TTGACCT** GCGGGCAGAC  
EXON 10

781 CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC CGTGGCCTTC  
EXON 10 Polymorphismusstelle: acgtc tgt

841 TCCCTCAGTG GCCGCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC  
EXON 10

901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG  
EXON 10 /Beginn EXON 11

961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTCTT GGGACAGCTT CCTCAA**AAATC**  
EXON 11

1021 TGGAACTGAG gaggctggag aaaggggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc  
EXON 11  
End of Open Reading Frame

1081 tgcccgaccc catctcattc aggtgttctc ttctatatcc cgggtgccat tccactaag  
EXON 11

1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg  
EXON 11

1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtcctcac  
EXON 11

1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctcccc agccctttgc aggccagca  
EXON 11

1321 gacttgagtc tgaggcccca ggccttagga ttctcccc agagccacta ctttgtcca  
EXON 11

1381 ggcctgggtg gtataggcg tttggccctg tgactatggc tctggacca ctagggtcct  
EXON 11

„Ban Polymorphismus“  
tctggcacta cta

1441 ggcctcttc ttattcatgc tttctcctt ttctacctt tttctctcc taagacacct  
EXON 11

1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt  
EXON 11 POLY A SITE

Anlage 2: Sequenz mit den beiden Polymorphismen  
(Numerierung nach der Levine-Sequenz)

1 ggggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT  
61 GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTC TGGCCTAGAG  
121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CCGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT  
181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG  
241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCCTC GCGCTCCTCC  
301 TGGGTCATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC  
361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG  
421 CTTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG  
481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATTG AGACTGGGCA GCAGAAGACT  
541 GTATTTGTGG GACACACGGG TGACTGCATG AGCCTGGCTG TGTCTCCTGA CTTCAATCTC  
601 TTCATTTTCG GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC  
661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCCATGGA  
721 GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGTGTGACCT GCGGGCAGAC  
781 CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC TGTGGCCTTC  
841 TCCCTCAGTG GCCGCTACT ATTGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC  
901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG  
961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTTCT GGGACAGCTT CCTCAAAATC  
1021 TGGAACTGAG gaggtctggag aaagggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagcccc  
1081 tgcccagacc catctcattc aggtgttctc ttctatattc cgggtgccat tcccactaag  
1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg  
1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtccctac  
1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gcccctcccc agccctttgc agggccagca  
1321 gacttgagtc tgaggcccca ggccctagga ttctctcccc agagccacta cttttgtcca  
1381 ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcacta ctagggtcct  
1441 ggcctcttc ttattcatgc tttctcctt ttctacctt tttctctcc taagacacct  
1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt



GS/jo 980364  
September 10, 1998

This invention relates to a new nucleic acid sequence coding for the Gbeta3-subunit of the human G protein and the use of the Gbeta3 subunits of the G proteins for determining the risk of developing a disease which is associated with a G protein dysregulation.

Heterotrimeric guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) are of outstanding importance in intracellular signal transduction. They mediate the relay of extracellular signals after stimulation of hormone receptors and other receptors which undergo a conformation change after receptor activation. This leads to activation of G proteins which subsequently can activate or inhibit intracellular effectors (for example, ion channels, enzymes). G proteins control intracellular signal processing after hormone stimulation of heptahelical receptors in the cell membrane, but also after stimulation of receptors with intrinsic tyrosine kinase activity. Regulated cell functions include among others cell division and cell growth, contraction, release of cell contents, and much more.

Heterotrimeric G proteins are composed of three subunits, the alpha, beta and gamma subunits. To date several different alpha subunits, 5 beta subunits and roughly 12 gamma subunits have been detected using biochemical and molecular biological methods (Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M., Signal transduction by G proteins: 1994 edition. J. Recept. Res. 15: 213-252, 1995; Offermans, S. and Schultz, G. Complex information processing by the transmembrane signalling system involving G proteins. Naunym Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 350: 329-338, 1994; Nuernberg, B., Gudermann, T. and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2, G proteins: structure and function. J. Mol. Med. 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotrimeric G protein: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80: 249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G proteins. FASEB J. 9: 1059-1066, 1995).

The receptor-mediated activation of certain alpha subunits can be inhibited by pretreatment with pertussis toxin (PTX). They include especially the alpha isoforms alpha-11, alpha-12 and alpha-13 and different alpha-subunits. These G proteins are also called "PTX-sensitive G proteins".

Betagamma subunits perform important functions in G protein activation and in the modulation of intracellular reactions. All previously known G protein beta subunits on the level of the nucleotide sequence and on the level of the amino acid sequence have high homologies. In this respect these similarities are found not only within the human beta subunits (Gbeta1, Gbeta2, Gbeta 3), but also in comparison with beta subunits of other species, for example fruit flies or yeasts.

Recently a base change in exon 10 (C825T) which leads to alternative splicing of exon 9 was described in the human GNB3 gene which codes for the Gbeta3 subunit. Alternative splicing is promoted by a cryptic splice site in exon 9, the base exchange C825T which is located farther away intensifying the splicing. The alternative splice product (Gbeta3s) has a loss of 123 bp (= 41 amino acids). The GNB3-825T allele is associated with increased activation capacity of G proteins and essential hypertension (Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E.; Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat. Genet.* 18(1): 45-48, 1998; Clapham, D.E. and Neer, E.J. G protein betagamma subunits. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 37:167-203, 1997; Hamm, H.E. and Gilchrist, A. Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin.Cell Biol.* 8:189-196, 1996).

This human GNB3 gene has been described by Levine et al. (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T. Jr., Helman, L.J. and Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 87(6), 2329-2333 (1990)).

The subject matter of the invention is a new human cDNA for the Gbeta3 subunit of human G protein.

It has been unexpectedly found that in the human GNB3 gene there is additional polymorphism which is called "C1429T" hereinafter. This polymorphism is

located at position 1429 of the cDNA. This corresponds to exon 11 of the pre-mRNA, but outside the open read frame in the 3' untranslated area.

This polymorphism is in pronounced distribution disequilibrium with the known C825T polymorphism such that almost all GBN3-825C alleles have the genotype 1429C and almost all GBN3-825T alleles have the genotype 1429T. Thus this polymorphism C1429T is just as well suited as polymorphism G825T for detection of increased activation capacity of G proteins.

The polymorphism C1429T is referenced to the cDNA sequence as was described by Levine et al. Here replacement of the C by a T takes place on position 1429 of the cDNA:

```
1381 qqcctgggtg gtatagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcac(c/t)a ctagggtcct
```

The complete cDNA sequence is listed in appendix 1.

Referenced to the genomic sequence of the GBN3 locus as was described by Ansari-Lari et al (Ansari-Lari, M.A., Muzny, D.M., Lu, J., Lu, F., Lilley, C.E., Spanos, S., Malley, T. and Gibbs, R.A. A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. *Genome Res.* 6 (4),314-326 (1996)), this polymorphism is located as follows (C59308T):  
59281 TTGGCCCTGT GACTATGGCT CTGGCAC(C/T)AC TAGGGTCCTG  
GCCCTCTTCT TATTCATGCT

The complete genomic sequence is listed in appendix 2.

This polymorphism is detected using methods which are familiar to one skilled in the art, such as specific hybridization, sequencing, PCR reaction with subsequent restriction analysis, DNA chip technology, single strand conformation polymorphism, etc. In one sample experiment detection was done by amplification of the corresponding gene section and subsequent analysis of the restriction fragment length polymorphism in which the restriction enzymes BanI, BshNI, Eco641 or their isoschizomers are used.

As a result there is good agreement between the genotype on positions 825 and 1429:

Genotype on position 825 of GNB3 cDNA	Genotype TT at position 1429 of cDNA	Genotype TC at position 1429 of cDNA	Genotype CC at position 1429 of cDNA
TT 119	111 (93,3 %)	8 (6,7%)	0
TC 116	3 (2,6 %)	103 (88,8 %)	10 (8,6 %)
CC 124	0 (0 %)	2 (1,6 %)	122 (98,4 %)

The new nucleic acid sequence can be used to produce antisense drugs for treatment or prevention of diseases, one nucleic acid sequence which is complementary nucleic acid sequence being used to produce the antisense drug. Here patients can be treated for example with antisense oligonucleotides or vectors for prevention of transcription or translation of the Gbeta3 subunit.

The subject matter of the invention is furthermore the use of beta3 subunits of G proteins for determining the risk of contracting a disease which is associated with G protein dysregulation.

Although the Gbeta3s splice variant which has polymorphism C1429T or which can be attributed to polymorphism C825T, in combination with the G protein subunits Galphai2 and Ggamma5, can form a functional heterotrimer, it was unclear how Gbeta3s leads to increased activation capacity of the G proteins.

The subject matter of this invention is based on the finding that the Gbeta3s subunit leads to increased activation capacity of G proteins. The increased activation capacity of G proteins was detected via transfection of the corresponding cDNAs and the expression of Gbeta3 and Gbeta3s in the COS-7 transfection system which is well known to one skilled in the art. Here it was found that the activation capacity of G proteins after transfection of Gbeta3s is clearly increased compared to Gbeta3 (Figure 1). To quantify the activation capacity of G proteins, here the incorporation of radioactively tagged [35S]GTPgammaS into G protein alpha-subunits after stimulation with the peptide mastoparan-7 (Mas-7) was measured.

Similar results can be achieved in the Sf9 insect cells expression system (Figure 2). Here the m2-muscarinergic receptor is expressed together with the G protein subunits Galphai3 and Ggamma5 and either Gbeta3 or Gbeta3-s in the Sf9 system. After stimulation with the agonist carbachol, in the presence of Gbeta 3, increased potency and increased efficiency of the agonist carbachol were observed with reference to the stimulation capacity of G proteins.

These experiments show that the splice variant Gbeta3-s is originally responsible for increased activation of G proteins. Furthermore these experiments prove that the protein is suitable for gene therapy for diseases which are associated with one such G-protein dysregulation for purposes of achieving increased cellular reactivity.

The diseases which are associated with G protein dysregulation are defined as those diseases in which the G protein is involved in signal transduction and does not perform its function physiologically. The dysregulation can have a series of causes, for example a change in the structure gene or an altered gene expression. This invention relates to diseases which are associated with the above described GNB3-825T allele or GNB3-1429 allele. They include diabetes mellitus (type 2), overweight and adiposity, coronary heart disease, immune diseases as a result of the intensified function of the immune system, and risky pregnancies with the danger of premature birth.

The following example relates to studies with the GNB3-825T allele. As a result of the extensive agreement (coupling equilibrium) between the genotype at positions 825 and 1429 these examples and the conclusions drawn from the experimental results are likewise valid for the GNB3-1429T allele.

### **1. Prediction of diabetes mellitus (type 2)**

Type-2 diabetes (synonyms: adult diabetes, non-insulin dependent diabetes) is a serious disease with high cardiovascular morbidity and mortality. Genetic influences and overweight contribute heavily to the pathogenesis. Type-2 diabetes often begins as insulin resistance which is first compensated by increased insulin secretion so that the affected individuals remain without symptoms (euglycemic). Only when the increased insulin secretion can no longer be maintained does diabetes with increased blood sugar levels occur. On the cellular level changes in components of insulin signal transduction, for example in the insulin receptor substrate 1 (IRS-1), PT-3 kinases, protein kinases, etc., can cause insulin resistance. But also after cell stimulation with agonists (for example, angiotensin II) which activate the G protein-coupled receptors can cellular insulin resistance be caused. The action of subsequent stimulation with insulin is then clearly reduced (Polonsky, K.S., Sturis, J., and Bell, G.I. Non-insulin dependent diabetes mellitus - A genetically programmed failure of the beta cell to

compensate for insulin resistance. *N. Engl. J. Med.* 334:777-783, 1996; O'Doherty, R. Stein, D. and Foley, J. Insulin resistance. *Diabetologia* 40 Suppl 3:B10-5:B10-5, 1997; Kahn, C.R., Vicent, D., and Doria, A. Genetics of non-insulin dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* 47:509-531, 1996; Hansen, T., Andersen, C.B., Echwald, S.M., Urhammer, S.A., Clausen, J.O., Vestergaard, H., Owens, D., Hansen, L. and Pedersen, O. Identification of a common amino acid polymorphism in the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness, and the insulin sensitivity index. *Diabetes* 46(3): 494-501, 1997; Folli, F., Kahn, C.R., Hansen, H., Bouchie, J.L. and Feener, E.P. Angiotensin II inhibits insulin signalling in aortic smooth muscle at multiple levels - A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin crosstalk. *J. Clin. Invest.* 100:2158-2169, 1997; Zhang, Y., Wat, N., Stratton, I.M., Warren-Perry, M.G., Orho, M., Groop, L. and Turner, R.C. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and b3-adrenergic receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. *Diabetologia* 39:1505-1511, 1996; Alming, K., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S. and Pedersen, O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 342:828-832, 1993; Laakso, M., Malkki, M., Kekalainen, P., Kuusisto, J., and Deeb, S.S. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 94: 1141-1146, 1994).

This G protein activation leads to phosphorylation of IRS-1 on serine residues, by which the phosphorylation induced by insulin on tyrosine residues is reduced. As a result a reduced interaction of IRS-1 occurs with the insulin receptor and the PI-3 kinase, i.e. reduced insulin action. An increased activation capacity of the G proteins which is caused by the GNB3 825T allele and the associated splice variant Gbeta3-s in vivo clearly intensifies the tendency to insulin resistance.

It has now been shown that with the simultaneous presence of mutations in components of insulin signal transduction (IRS1 gene, 3931A variant, Gly971Arg, p85 alpha regulatory subunit of PI3 kinase (1020 G -> A; codon 326 Met -> Ile; beta3 adrenergic receptor (Trp64Arg); beta2-adrenergic receptor (here especially Arg16Gly

variant and the Gln27Glu variant); tumor necrosis factor alpha; leptine or the leptine receptor) which lead to insulin resistance, and the GNB3-825T allele, the tendency to insulin resistance and to diabetes rises drastically. This connection opens the possibility of diagnosis of a type-2 diabetes mellitus associated with the GNB3-825T allele and prediction of one such genetically induced tendency to type-2 diabetes mellitus in still healthy individuals without complaints.

The DNA from more than 700 patients with type-2 diabetes and from 1400 healthy controls was obtained for proof. The frequencies of the GNB3-825T allele and the IRS-1-Gly971Arg variant were compared. Table 1 shows first of all a comparison of the allele frequencies in controls and cases:

Table I: Allele frequencies in controls and type 2 diabetics

		Controls			Diabetics		
		All	Men	Women	All	Men	Women
Total, n		1464	962	502	720	320	400
Genotype, n (%):							
GNB3	TT	116 (8)	83 (9)	33 (7)	61 (8)	32 (10)	29 (7)
	TC	585 (40)	360 (37)	225 (45)	345 (48)	161 (50)	184 (46)
	CC	763 (52)	519 (54)	244 (49)	314 (44)	127 (40)	187 (47)
		0.28	0.27 <sup>1</sup>	0.29	0.32 <sup>2</sup>	0.35 <sup>3</sup>	0.30
IRS1	AA	5 (0)	4 (0)	1 (0)	8 (1)	4 (1)	4 (1)
	AG	159 (11)	108 (11)	51 (10)	108 (15)	58 (18)	50 (13)
	GG	1300 (89)	850 (88)	450 (90)	604 (84)	258 (81)	346 (87)
	GA	0.06	0.06	0.05	0.09 <sup>4</sup>	0.10 <sup>5</sup>	0.07 <sup>6</sup>
Age (SD)		49 (10)	48 (10)	50 (9)	63 (9)	62 (9)	64 (9)
Age when diagnosed (SD)					46 (10)	45 (10)	47 (10)
BMI, kg / m <sup>2</sup> (SD)		26.9 (3.9)	27.0 (3.4)	26.3 (4.8)	28.9 (4.8)	28.4 (4.4) <sup>6</sup>	29.3 (5.0)
Nephropathy, n (%)					198 (31)	105 (36)	93 (28)
Hypertension, n (%)					464 (67)	181 (59)	283 (73)

Values correspond to n (%) for alleles and diabetes-associated diseases and averages (SD) for continuous variables.<sup>1</sup>,  $p < 0.02$  ( $\chi^2 = 8.1$ ) versus control females; <sup>2</sup>,  $p < 0.001$  ( $\chi^2 = 14.4$ ) versus all controls; <sup>3</sup>,  $p < 0.001$  ( $\chi^2 = 20.0$ ) versus control males; <sup>4</sup>,  $p < 0.005$  ( $\chi^2 = 12.9$ ) versus all controls; <sup>5</sup>,  $p < 0.01$  ( $\chi^2 = 13.2$ ) versus control males; <sup>6</sup>,  $p < 0.14$  ( $\chi^2 = 3.1$ ) versus control females.

The following tables IIa and IIb show the risk for carriers of the GNB3-825T allele or carriers of the IRS-3931A allele (simple effects, Table II.1) or for carriers of both alleles (combined effects Table II.2) for developing type-2 diabetes. The risk here is expressed as an age-adjusted odds ratio, the odds ratio for the case-control studies corresponding roughly to the relative risk in prospective studies.



Table II: Odds ratios for diabetes for carriers of the GNB3-T825 allele, the IRS-A-3931 allele or both alleles

Age-adjusted odds ratios are shown

II.1 Single effects

Genes	Allele	All					Men					Women				
		Control (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-value		control (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-value		Control (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-value	
<b>GNB3</b>	TT/CC	116 / 763	61 / 314	1.25 (0.81- 1.92)	0.3180		83 / 519	32 / 127	1.44 (0.83- 2.51)	0.2002		33 / 244	29 / 187	1.22 (0.60 - 2.46)	0.5882	
<b>GNB3</b>	TC/CC	585 / 763	345 / 314	1.48 (1.17- 1.87)	0.0011		360 / 519	161 / 127	1.86 (1.35- 2.57)	0.0002		225 / 244	184 / 187	1.12 (0.79 - 1.58)	0.5351	
<b>GNB3</b>	TT + TC/CC	701 / 763	406 / 314	1.44 (1.15- 1.80)	0.0015		443 / 519	193 / 127	1.78 (1.31- 2.43)	0.003		258 / 244	213 / 187	1.13 (0.80- 1.58)	0.4834	
<b>IRS1</b>	AA/GG	5 / 1300	8 / 604	2.26 (0.53- 9.59)	0.2686		4 / 850	4 / 285	1.71 (0.32- 9.12)	0.5300		1 / 450	4 / 346	6.74 (0.42- 109.57)	0.1797	
<b>IRS1</b>	AG/GG	59 / 1300	108 / 604	1.35 (0.97- 1.89)	0.0802		108 / 850	58 / 258	1.76 (1.14- 2.69)	0.0100		51 / 450	50 / 346	0.99 (0.57- 1.72)	0.9762	
<b>IRS1</b>	AA + AG/GG	164 / 1300	116 / 604	1.38 (1.00- 1.92)	0.0531		112 / 850	62 / 258	1.75 (1.15- 2.67)	0.0086		52 / 450	54 / 346	1.07 (0.62- 1.83)	0.8122	

Table II: Odds ratios for diabetes for carriers of the GNB3-T825 allele, the IRS1-A-3931 allele or both alleles

Age-adjusted odds ratios are shown

II.2 Combined effects

Genes	Allele	All				Men				Women			
		Control (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-value	Control (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-value	Control (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-value
<i>GNB3</i> ( <i>IRS1</i> <i>GG</i> )	TT / CC	106 684	50 264	1.13 (0.70- 1.81)	0.6156	75 461	25 104	1.31 (0.71- 2.42)	0.3926	31 223	25 160	1.09 (0.52- 2.32)	0.8157
<i>GNB3</i> ( <i>IRS1</i> <i>GG</i> )	TC / CC	510 684	290 264	1.53 (1.19- 1.96)	0.0010	314 461	129 104	1.90 (1.33- 2.70)	0.0004	196 223	161 160	1.19 (0.82- 1.72)	0.3600
<i>GNB3</i> ( <i>IRS1</i> <i>GG</i> )	TT+TC/ CC	616 / 684	340 264	1.46 (1.15- 1.86)	0.0022	389 461	154 104	1.78 (1.27- 2.50)	0.0008	227 223	186 160	1.18 (0.82- 1.68)	0.3743
<i>IRS1</i> ( <i>GNB3</i> CC)	AA + AG / GG	79 684	50 264	1.48 (0.90- 2.43)	0.1198	58 461	23 104	1.78 (0.93- 3.38)	0.0782	21 223	27 160	1.33 (0.59- 3.00)	0.4984
<i>IRS1</i> + <i>GNB3</i>	TT + AA or AG/ CC + GG	10 684	11 264	3.38 (1.13- 10.08)	0.0291	8 461	7 104	4.03 (1.12- 14.56)	0.0333	2 223	4 160	3.39 (0.49- 31.60)	0.1975
<i>IRS1</i> + ( <i>GNB3</i> )	TC + AA or AG / CC + GG	75 684	55 264	1.69 (1.05- 2.73)	0.0311	43 461	32 104	2.82 (1.52- 5.23)	0.0010	28 223	23 160	0.89 (0.41- 1.93)	0.7706
<i>IRS1</i> + <i>GNB3</i>	TC or TT + AA or AG / CC + GG	85 684	66 264	1.87 (1.19- 2.92)	0.0062	54 461	39 104	2.99 (1.69- 5.30)	0.0002	31 223	27 160	1.05 (0.51- 2.17)	0.8959

A clear risk increase for type-2 diabetes for carriers of the GNB3-825T allele or carriers of the IRS-3931A allele (Tables II.1 and II.2) is apparent. A drastic risk increase can be found in individuals in whom both genes are changed. Thus the detection of the GNB3-825T allele can be used to ascertain in the affected individual the tendency to develop type-2 diabetes or to determine a genetically induced cause of a condition which has already occurred.

## **2. Prediction of adiposity/overweight**

The regulation of the body mass index (BMI), a measure of the ratio of body weight to body size, is determined by many genes. Overweight is up to roughly 40% genetically determined, but is also caused by excess calorie intake with existing lack of exercise. The Gbeta3-s splice version is associated with the cellular phenotype of increased cell growth. Thus it is also possible that the GNB3-825T allele predisposes to increased body growth, among others overweight, and can exert epistatic and hypostatic effects. In doing so, as in diabetes mellitus (type 2) there can be a relationship to changes in the IRS1 gene (3931A variant; Gly971Arg), in the gene which codes for the beta3 adrenergic receptor (Trp64Arg variant) and in the gene which codes for the beta2 adrenergic receptor, here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant.

Studies on transgenic mice have shown that the lack of the gene which codes for the IRS-1 protein in contrast leads to a serious delay of body growth (Tamemoto, H., Kaowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., Sekihara, H., Yoshioka, S., Horikoshi, H., Furuta, Y., Ikawa, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., and Aizawa, S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 182-186, 1994).

In order to check the correlation of adiposity with the presence of the GNB3-825 nucleotide and the status of the IRS1 gene with respect to the presence of the Gly971Arg variant, the BMI was measured in 20-30 year old healthy males in whom at the same time the status of the GNB3-825 nucleotide and the status of the IRS1 gene were studied with respect to the presence of the Gly971Arg variant. The result is shown in Figure 3.

Figure 3 shows the frequency distribution of the measured values for the BMI. In the presence of the more frequent IRS1 "GG" genotype a significant tendency to increased BMI can be detected with the GNB3-825T allele compared to the GNB-825 allele. The odds ratio for the 75% quartile compared to the 25% quartile is 2.5. Conversely, the tendency to increased BMI in carriers of the GNB3-825T allele with the simultaneous presence of the IRS1-3931A allele (Gly971Arg variant) is clearly counteracted. This illustrates the interactive effect of GNB3 and IRS1 on the BMI. Thus, the presence of the GNB3-825T allele can reliably correlate with adiposity. It is therefore possible to predict a tendency to adiposity in carriers of this allele, especially those in whom at the same time the IRS1-3931A allele (Gly971Arg variant) is lacking.

### **3. Prediction of coronary heart disease and atherosclerosis**

It is already known that coronary heart disease can be associated with a G protein dysregulation. In order to verify a relationship between the occurrence of coronary heart disease and the presence of the GNB3-825T allele, patients with angiographically precluded coronary heart disease, with coronary heart disease (without myocardial infarction), with myocardial infarction and with more than one myocardial infarction were checked for the presence of this allele. The result is shown in Figure 4.

Figure 4 shows the frequency of the GNB3-825T allele in patients with angiographically precluded coronary heart disease (CHD), with (CHD) (without myocardial infarction; MI), with myocardial infarction MI and with more than one myocardial infarction.

A clear rise is apparent in the frequency of the GNB3-825T allele in CHD and MI. The risk for CHD and MI is roughly doubled by the GNB3-825T allele compared to controls without CHD.

Patients with mutation in the IRS-1 protein (3931A allele; Gly971Arg variant) however experience a clear risk reduction by up to 50% in the presence of the GNB3-825 allele or GNB3-825T allele. This change in the IRS-1 protein therefore exerts hypostatic effects, i.e. this variant protects against coronary heart disease.

If we compare patients with CHD to individuals with coronary-angiographically precluded CHD, the odds ratios are as follows:

KHK positive	KHK negative	OR	P - value
GNB3 + IRS1-Status	GNB3 + IRS1-Status		
TT/TC + AG/AA	TT/TC + GG	0.94	not significant
TT/TC + GG	CC + GG	1,4	0.003
TT/TC + GG	CC + AG/AA	2,8	0.002

Thus the correlation between the presence of the GNB3-825T allele and the occurrence of coronary heart disease is proven. Thus it is possible to predict a tendency to coronary heart disease in carriers of this allele, especially those in whom the IRS1-3931A allele (Gly971Arg variant) is lacking.

One special application is the prediction of a coronary heart disease, but also in general of the cardiovascular risk (high blood pressure, etc.) in women with the objective of administering to them controlled, post-menopausal hormone therapy with the female sex hormone in order to reduce cardiovascular risk.

Another application is the prediction of increased risk for myocardial infarctions and sudden cardiac death. This is associated among others with G proteins also controlling ion channels. More accurately, the G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  subunits of G proteins control the function of diverse ion channels, for example Na<sup>+</sup> channels, Ca<sup>2+</sup> channels and K<sup>+</sup> channels. More accurately matched regulation of these ion channels is of great importance for all electrically excitable tissues, especially for the heart (De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A. and Campbell, K.P. Direct binding of G protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385 (6615): 446-450, 1997; Ma, J.Y., Catterall, W.A., and Scheuer, T. Persistent sodium current through brain sodium channels induced by G protein betagamma subunits. *Neuron* 19(2): 443-452, 1997; Kofuji P., Davidson, N. and Lester, H.A. Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are activated by Gbetagamma subunits and function of heteromultimers. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92: 6542-6546, 1995; Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D.E. Gbetagamma binds directly to the G protein-gated K<sup>+</sup> channel, I<sub>KACH</sub>, *J. Biol. Chem.* 270:29059-29062, 1995).

It has been found that individuals carrying the GNB3-T825 allele have intensified activity of myocardial  $K^+$  channels. This leads to accelerated repolarization of the cardiac muscle cell and thus to shortened refractory time. These individuals are thus subject to increased risk for cardiac irregularities, especially ventricular tachycardias, extrasystoles, ventricular flutter and ventricular fibrillation. They bear an increased risk for sudden cardiac death also within the framework of acute myocardial infarction.

Finally, carriers of the GNB3-825T allele already at an age from 20 to 30 show clear changes of the properties of the blood vessels. Especially conspicuous are an increased pulse rate, increased cardiac output and increased pulse pressure. These phenomena express an early-onset tendency to increased stiffness of the blood vessels (reduced compliance) as an indicator for atherosclerosis. Genotyping to ascertain the GNB3-825T allele status is thus suited to ascertaining an increased risk of atherosclerosis.

#### **4. Prediction of increased immune system function**

G proteins and G protein-coupled receptors are also found in all cells of the immune system, especially also in leukocytes. Chemotaxis of cells is mediated mainly by betagamma subunits of heterotrimeric G proteins. Thus the GNB3-825T allele should lead to increased reactivity of the immune system, especially to intensified immune defense.

In fact, neutrophilic granulocytes of carriers of the GNB3-825T allele have increased chemotaxis compared to the peptide fMLP (Figure 5). fMLP is a peptide which is representative of a host of bacterial peptides and which stimulates chemotactic reactions. It is therefore used as a test system for measurement of chemotactic reactions of cells which is well known to one skilled in the art. The fMLP receptor, as is known, activates the pertussis toxin-sensitive G proteins. The statement that granulocytes of carriers of the GNB3-825T allele show intensified fMLP-stimulated chemotaxis is in agreement with the fact that chemotaxis of heterodimeric betagamma subunits is mediated.

This phenomenon can also be detected in other leukocytes as well, for example, lymphocytes. Thus there is a correlation between the GNB3-825T allele and increased chemotaxis of cells of the immune system, for example neutrophilic granulocytes, T lymphocytes, or B lymphocytes.

Furthermore, in carriers of the GNB3-825T allele an increased tendency toward proliferation of cells of the immune system, especially also after inoculations, is observed.

Healthy carriers of the GNB3-825T allele show an increased number of leukocytes and CD4-positive T lymphocytes (absolute and percentage) with an increased CD4/CD8 quotient. Figure 6 shows this for an increased number of CD4 lymphocytes. This can also be detected at patients whose CD4-number is indicating the heaviness of the disease or the length of life (fig.7). Associated with this is an enhanced affection to keep an increased number of CD4-positive T lymphocytes in spite of the HIV infection. Conversely, carriers of the GNB3-825T allele also show an increased tendency to developing AIDs after a HIV infection, see also 7., also in conjunction with the detection of the aforementioned gene change in chemokine receptors, especially a  $\Delta 32$  deletion in the CCR5 receptor or in the area of the promotor of this gene.

Finally, among affected individuals, increased release of immune-modulator substances, hormones and other substances from leukocytes is observed (cytokines, interleukins, growth factors, antibodies, vaso-active substances). In this connection intensified immune defense also arises after transplantation of organs or tissues (kidneys, heart, bone marrow, lungs, skin, liver, etc.) with the danger of transplant rejection. In addition, this results in an increased tendency to autoimmune conditions (rheumatism, ulcerative colitis, Crohn's disease) and to allergic conditions, for example, of the skin, the respiratory passages or other organs (for example, neurodermatitis, hay fever, bronchial asthma). This is also observed in combination with the detection of other gene changes, for example in the beta2-adrenergic receptor, here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant.

## **5. Prediction of increased CO<sup>2</sup> or hypoxia tolerance**

As is recognized, G proteins are also involved in the regulation of the respiratory drive by hypoxia or hypercapnia (Prabhakar, N.R., Kou, Y.R., and Kumar. G.K. G proteins in carotid body chemoreception. *Biol. Signals* 4:271-276, 1995; Cachero, T.G., Rocher, A. Rigual, R.J. and Gonzalez, C. Effects of fluoride and cholera and pertussis toxins on sensory transduction in the carotid body. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 269:C1271-C1279, 1995).

It has been found that probands who carry the GNB3-825T allele show a reduced drive of respiration (respiratory minute volume) when the inspired pCO<sub>2</sub> is increased and thus increased CO<sub>2</sub> tolerance. Increased CO<sub>2</sub> tolerance thus represents an increased risk especially for those individuals in whose working environment CO<sub>2</sub> accumulation can occur. Reduced CO<sub>2</sub> sensitivity thus entails an increased risk for spontaneously occurring unconsciousness, for example, within the framework of the narcotic effect of CO<sub>2</sub>. Especially affected here are professional divers, tunnel workers, pilots, submariners, etc. With the detection of the GNB3-825T allele these individuals can be identified and warned so that the accident risk is reduced.

## **6. Prediction of osteoporosis**

Generalized osteoporosis represents one of the most frequent diseases of post-menopausal women and entails an increased risk of bone fractures. G proteins are significantly involved in processes which lead to rebuilding bone. The altered activation capacity of G proteins is thus heavily involved in the osteoporosis risk (May, L.G. and Gay, C.V. Multiple G protein involvement in parathyroid hormone regulation of acid production by osteoclasts. *J. Cell Biochem* 64(i): 161-170; 1997; Gordeladze, J.O., Lund, H.W., Jablonski, G., and Bruland, O.S. Diverse expression of G proteins in human sarcoma cell lines with different osteogenic potential: Evidence for the involvement of G<sub>12</sub> in cell proliferation. *J. Cell Biochem.* 60:95-106, 1996).

In this case as well female carriers of the GNB3-825T allele show an increased risk of developing osteoporosis.



## **7. Prediction of Alzheimer's disease**

Altered activation capacity of G proteins and altered regulation of K<sup>+</sup> channels have been described in patients with Alzheimer's disease. Furthermore, reduced activation of the adenylcyclase after stimulation of beta-adrenergic receptors was described. These phenomena can be attributed to increased activation capacity of pertussis toxin-sensitive G proteins with expression of the Gbeta3s splice variant (Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E. and Nishimoto, I. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J.Biol. Chem.* 270: 4205-4208, 1995; Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y., and Ogata, E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G<sub>0</sub>. *Nature* 362:75-79, 1993; Etcheberrigaray, R., Ito, E., Oka, K., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E. and Alkon, D.L. Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 90: 8209-8213, 1993; Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Zakeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T.B., Giambarella, U., and Nishimoto, I. G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* 272:1349-1352, 1996; Cowburn, R.F. Wichager, B., Ravid, R., and Winblad, B. Acetylcholine muscarinic M2 receptor stimulated [<sup>35</sup>S]GTPgammaS binding shows regional selective changes in Alzheimer's disease postmortem brain. *Neurodegeneration* 5:19-26, 1996).

Consequently, carriers of the GNB3-825T allele have an increased risk of developing Alzheimer's disease. At the same time the early-onset atherosclerosis described under 3 which is observed in carriers of the GNB3-825T allele contributes to the formation of Alzheimer's disease.

## **8. Prediction of sexual dysfunction**

Due to the predisposition of carriers of the 825T allele for vascular arteriosclerotic alteration, the risk of masculine erectile dysfunction and organically based impotence raises. This is due to the fact, that augmented arteriosclerosis leads to a reduction of the augmented blood flow into the cavernous body, which is necessary for a erection. At women the existence of a 825T allele can lead analogously to a

reduced blood circulation of the sexual organs (e.g. the clitoris) and hence to a reduced sexual sensitivity and ability to undergo an orgasm.

#### **9. Prediction of thyroid gland dysfunctions**

Carriers of the 825T allele often have thyroid gland dysfunctions and must be treated with thyroid hormones (for example thyroxin).

#### **10. Prediction of increased pregnancy risk**

Hypertension, edema formation and the so-called "HELLP syndrome" entail a serious danger for pregnancy, both for the life of the mother and also the life of the fetus. It was found that in carriers of the 825T allele who develop gestational hypertension (gestosis, preeclampsia) there is a high risk of premature birth (delivery before the 37th week of pregnancy or birth weight of the child less than 2500 g, see also 14.), for these children in addition there being the risk for stillbirth or post-delivery death. At the same time in women who are carriers of the 825T allele and who are suffering from gestosis, the risk of spontaneous abortion (habitual abortion) increases.

Detection of the 825T allele is therefore suited for predicting an increased risk of death for the unborn child of pregnant mothers with gestosis.

Another subject of this invention is the pharmacogenetics of the GNB3-825T allele, i.e. the possibility of predicting the action of pharmaceuticals using the genotype.

Most pharmaceuticals (hormones, receptor agonists) exert their effect via receptors which couple to G proteins. Antagonists block the hormone receptor interaction.

It has now been ascertained that genotyping on the GNB 3 locus is suitable for predicting the effectiveness of pharmaceuticals using the genotype. This relates to responsivity in vivo to hormones, transmitters (also neurotransmitters) or pharmaceuticals which activate those G protein heterotrimers which contain the G protein subunits Gbeta3 and Gbeta3s. This goes along with the prediction of reduced effectiveness of hormones, neurotransmitters or pharmaceuticals which stimulate the G-protein subunit, for example beta adrenergic agonists. This also applies with the simultaneous use of detection of the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant in the

beta2 adrenergic receptor. The presence of the GNB3-825T allele therefore shows altered pharmacogenetics and should be considered in the specific choice of a form of therapy (pharmacological or non-pharmacological) and in the dosages of pharmaceuticals or hormones in hypertension, diabetes mellitus, coronary heart disease, acute myocardial infarction with or without cardiac irregularities, cardiac irregularities, transplant rejection, etc.

In this connection the presence of the GNB3-825T allele however also allows the prediction of the effectiveness of administering erythropoietin on blood cell formation and the prediction of the occurrence of hypertension during this therapy as well as the prediction of the danger of developing hypertension during immunosuppressive therapy (for example, with cyclosporin).

Likewise in this connection the effectiveness of substances for treatment and prevention of migraine attacks (agonists on the serotonin receptor) can be predicted.

This is demonstrated on the following example. An alpha2 adrenergic agonist (BHT 933) was applied intracoronary in the probands; it leads to contraction of coronary vessels. This effect was quantified via the flow change through these sections of the vessels. As Figure 8 shows, an intensified reduction of coronary blood flow in carriers of the GNB3-825T allele is observed, regardless of whether they are suffering from a coronary heart disease (CHD). This means that in carriers of the GNB3-825T allele the intensification of the action of these pharmaceuticals can be predicted.

Another subject of this invention is production of pharmaceuticals which inhibit the Gbeta3s splice variant.

Fundamentally it is possible to synthesize chemicals which inhibit the function of the Gbeta3s protein by their leading for example to accelerated decomposition of the protein or by inhibiting its interaction and combination with alpha and gamma subunits of the human G protein. To identify these substances a screening system is necessary. To do this the expression of the Gbeta3s subunit alone or in combination with different Galpha and Gbeta subunits in Sf9 insect cells, in other cells suitable for transfection, or the use of purified Galpha and Ggamma3s subunits in a reconstitution system in the presence or absence of G-protein-coupled receptor is

suitable. By means of these systems for example the action of chemicals on the receptor-mediated binding of GTP to the G $\alpha$  subunits can be studied, by which ultimately chemicals can be identified which inhibit the function of the G $\beta\gamma$  subunit. One such test system can fundamentally also be used as a "high-throughput screening system" for testing of a host of substances.

### Claims

1. Nucleic acid sequence coding for the Gbeta3 subunit of the human G protein with the sequence described in Appendix 1.

2. Nucleic acid sequence coding for the Gbeta3 subunit of the human G protein with the sequence described in Appendix 2.

3. Use of a gene change in the gene for the Gbeta3 subunit of the human G protein, at position 825 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine and/or at position 1429 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine, for determination of the risk of developing a disease which is associated with G protein dysregulation.

4. Use as claimed in claim 3 for determining the risk of developing diabetes mellitus type 2, overweight and adiposity, hypercholesterolemia, coronary heart disease, myocardial infarction, sudden cardiac death, osteoporosis, atherosclerosis, neurodegenerative or cerebrovascular conditions, especially Alzheimer's disease and/or a disease, which is based on the increased reactivity of the immune system.

5. Use of a gene change in the gene for the Gbeta3 subunit of the human G protein, at position 825 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine and/or at position 1429 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine, for predicting the risk of women for developing a cardiovascular condition, especially high blood pressure or coronary heart disease or for preparing a specific hormone therapy in order to reduce the cardiovascular risk.

6. Process for determining the risk of a proband for developing a disease associated with G protein dysregulation in which the gene sequence for the Gbeta3 subunit of the human G protein of the proband compares with the gene sequence in Appendix 1 and/or Appendix 2 and for the case in which it agrees with the gene sequence in Appendix 2 in position 825 and/or in position 1429, assigns an increased disease risk to the proband.

7. Process as claimed in claim 6, wherein to determine the risk of developing diabetes mellitus type 2, gene changes in the IRS1 gene (3931A variant; Gly971Arg),

in the IRS2 gene, in the gene which codes for the p85 alpha regulatory subunit of PI3 kinase (1020 G -> A; codon 326 Met -> Ile), in the gene which codes for the beta3 adrenergic receptor (Trp64Arg), in the gene which codes for the beta2-adrenergic receptor (here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant), in the gene which codes for the tumor necrosis factor alpha and/or in the gene which codes for leptine or the leptine receptor, are studied at the same time.

8. Process as claimed in claim 6, wherein to determine the risk of developing overweight and adiposity, gene changes in the IRS1 gene (3931A variant; Gly971Arg), in the gene which codes for the beta3 adrenergic receptor (Trp64Arg), and/or in the gene which codes for the beta2-adrenergic receptor (here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant) are studied at the same time.

9. Process as claimed in claim 6, wherein to determine the risk of developing coronary heart disease and/or myocardial infarction, gene changes in the IRS1 gene (3931A variant; Gly971Arg) are studied at the same time.

10. Process as claimed in claim 6, wherein to determine the risk of developing diseases which are associated with increased reactivity of the immune system, gene changes in the beta2-adrenergic receptor (here especially the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant) are studied at the same time.

11. Use of a gene change in the gene for the Gbeta3 subunit of the human G protein, at position 825 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine and/or at position 1429 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine, for identifying individuals with increased CO<sub>2</sub> or hypoxia tolerance.

12. Use of a gene change in the gene for the Gbeta3 subunit of the human G protein, at position 825 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine and/or at position 1429 in Appendix 2 there being substitution of cytosine by thymine, for predicting the responsivity of a proband in vivo to hormones, transmitters (also neurotransmitters) or pharmaceuticals which activate those G protein heterotrimers which contain the G protein subunits Gbeta3 and Gbeta3s and/or which stimulate the G protein subunit GalphaS.

13. Use as claimed in claim 12 for predicting the responsivity of a proband, at the same time the Arg16Gly variant and the Gln27Glu variant being detected in the beta2 adrenergic receptor.

14. Use as claimed in claim 12 or 13 for specific choice of a pharmacological or non-pharmacological form of treatment and the dosages of pharmaceuticals or hormones in hypertension, diabetes mellitus, coronary heart disease, acute myocardial infarction with or without cardiac irregularities, cardiac irregularities, and transplant rejection.

15. Use as claimed in claim 12 or 13, for prediction of the effectiveness of administering erythropoietin on blood cell formation and/or the prediction of the formation of hypertension during this therapy.

16. Use as claimed in claim 12 or 13, for prediction of the danger of developing hypertension during immunosuppressive therapy, especially with cyclosporin.

17. Use as claimed in claim 12 or 13 for prediction of the effectiveness of substances for treatment and prevention of a migraine attack.

19. Use of a nucleic acid sequence which is complementary to the nucleic acid sequence as claimed in claim 1 or 2, for producing an antisense pharmaceutical for treatment or prevention of diseases.

20. Use of a protein of the Gbeta3s subunit of the human G protein in recombined systems or after transfection in suitable cell lines for identifying chemicals which inhibit the function of Gbeta3s.

Fig. 1

The expression of G $\beta$ 3 and G $\beta$ 3-s in the COS-7 cells. The activability of G proteins is quantified by the incorporation of [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S. The G-proteins are stimulated with the peptide mastoparan-7 (Mas-7).

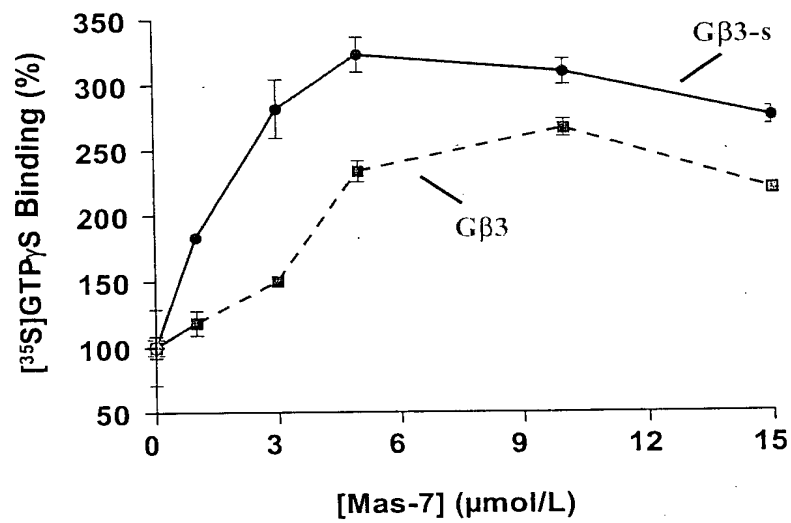




Fig. 2

Expression of G $\beta$ 3 and G $\beta$ 3-s in Sf9 insect cells whereby G $\alpha$ i3, G $\gamma$ 5 and m<sub>2</sub>-muscarinic receptor are simultaneously expressed. The activability of G proteins is quantified by the incorporation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. The G proteins are stimulated with carbachol.

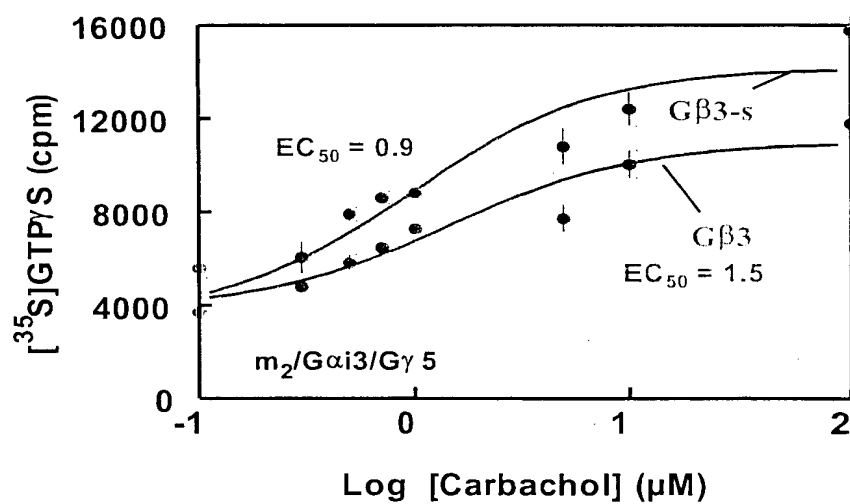


Fig. 3

Regulation of the body mass index of men aged 20-30 depending on the GNB3- and IRS1-genotype. Individuals with IRS1 GG-genotype bearing the GNB3 825T-allele show an increased BMI. This effect is countered by the IRS1-allele.

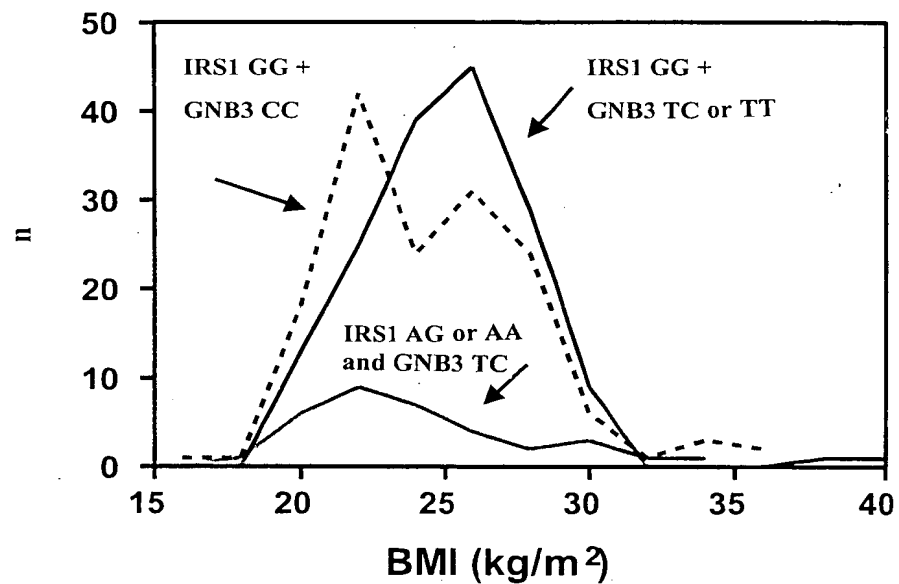


Fig.4

Frequency of the GNB3 825 T-allele at coronary heart disease (CHD) and myocardial infarction.

No CHD = angiographically precluded CHD

CHD = coronary heart disease without myocardial infarction

MI = coronary heart disease with myocardial infarction

MI > 1 coronary heart disease with more than one anamnestic myocardial infarction.

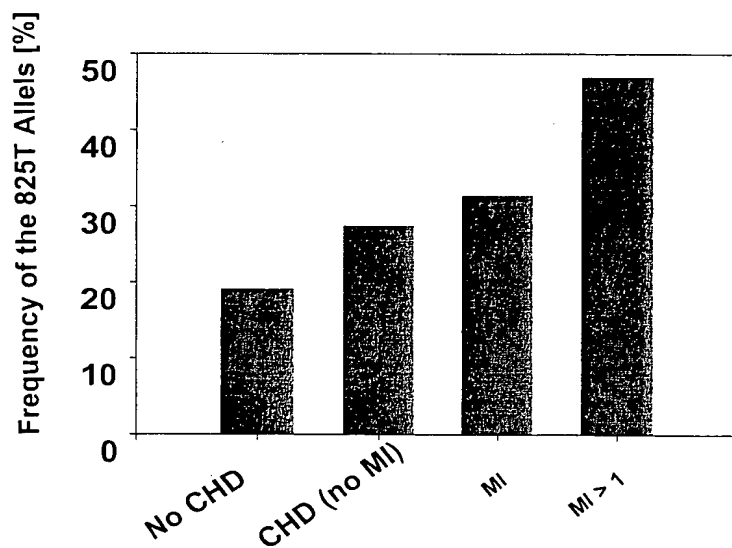


Fig.5

fMLP - stimulated chemotaxis at human neutrophilic granulocytes depending on the GNB3 genotype.

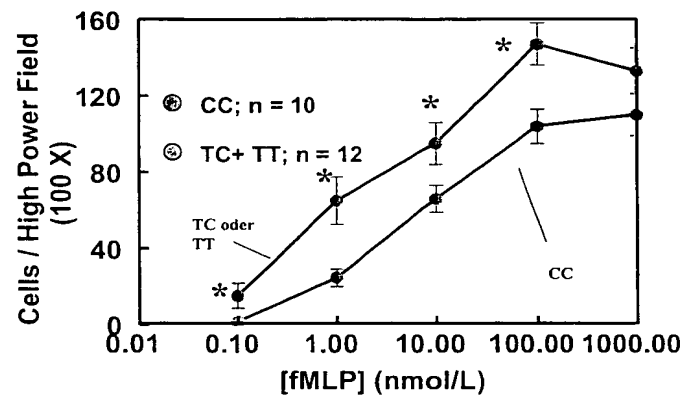


Fig. 6

CD 4 Count (number of CD4-positive T lymphocytes /  $\mu$ l) at male, healthy blood donors (non-smokers) depending on the GNB3 - genotype.

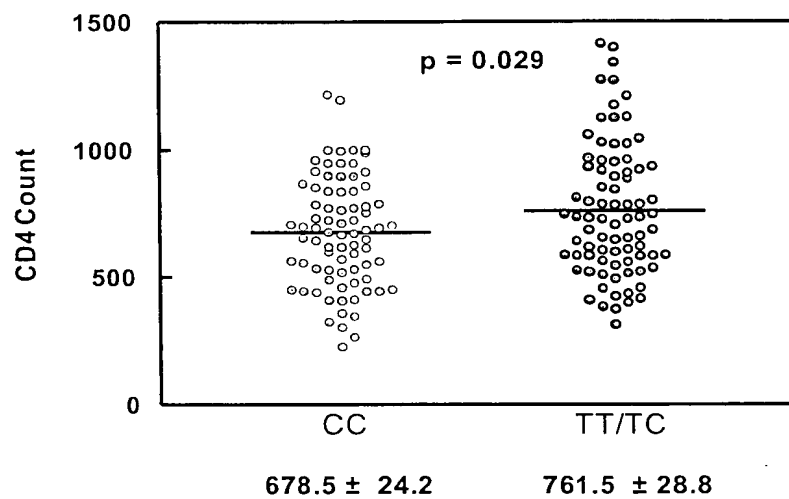


Fig. 7

CD 4 Count (number of CD4-positive T-lymphocytes /  $\mu$ l) at male HIV positive patients depending on the GNB3 - genotype.

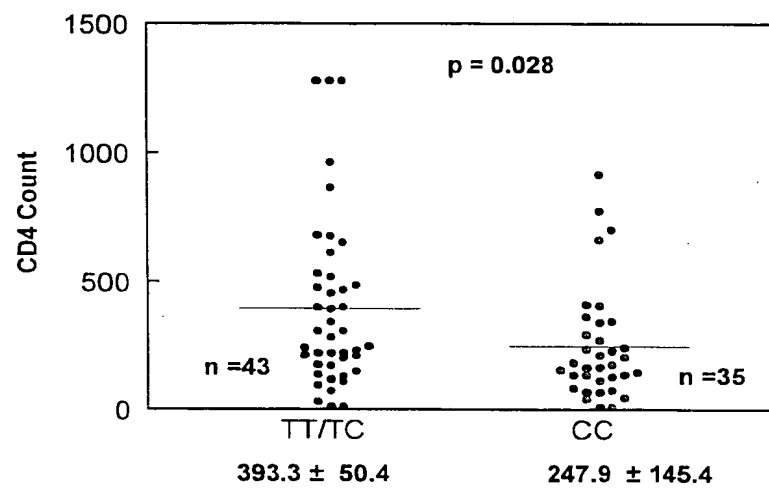
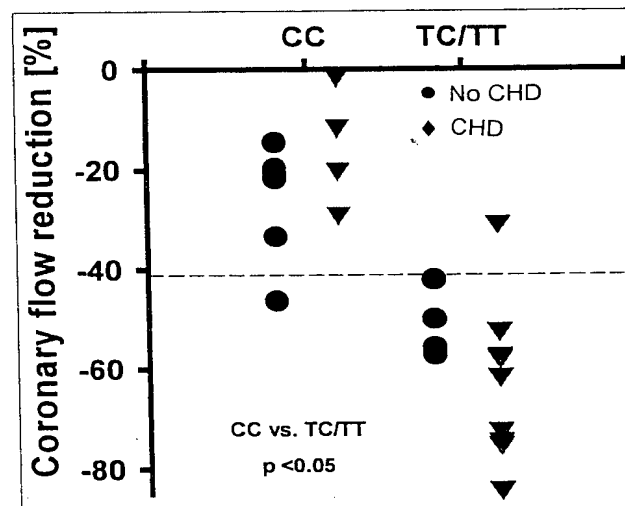


Fig. 8:

Effect of an intracoronary of the alpha2 adrenergic agonist BHT 933 on the coronary blood flow depending on the GNB3 genotype



1 gggtcgatgg gggagatgga gcaactgctg caggaaagcgg agcagctcaa gaagcagatt  
Start ATG EXON 3 after Ansari-Lari  
Nucleotides 1-6 seem not to be affected

61 gcagatgccca ggaaagcctg tgctgacggt actctggcag agctggtgtc tggcctagag  
/beginning EXON 4 /EXON 5 Beginn  
==> ENDE 1 KLON ANSARI

121 gtggtgggac gagtccagat gcgacgctg cgacgttaa ggggacacct ggccaagatt  
EXON 5

181 tacgccatgc actgggccac tgattctaag ctgctggttaa gtgcctcgca agatgggaag  
EXON 5 / beginning EXON 6

241 ctgatcggtg gggacagcta caccaccaac aaggtgcacg ccattccact gcgctcctcc  
EXON 6 / EXON 7

301 tgggtcatga cctgtgctta tgccccatca gggaactttg tggcatgtgg ggggctggac  
EXON 7

361 aacatgtggt ccattctaca cctcaaatcc cgtgagggca atgtcaaggt cagccgggag  
EXON 7

421 ctttctgctc acacaggtta tctctcctgc tgccgcttcc tggatgacaa caatattgtg  
EXON 7 /EXON 8

481 accagctcgg gggacaccac gtgtgccttg tgggacattg agactgggca gcagaagact  
EXON 8 /EXON 9

cryptic SPLICING

541 gtatttgtgg gacacacggg tgaactgcac agcctggctg tgtctcctga cttcaatctc  
EXON 9  
cryptic SPLICING

601 tctatttcgg gggcctgtga tgccagtgcc aagctctggg atgtgcgaga ggggacctgc  
EXON 9  
cryptic SPLICING /

661 cgtcagactt tcaactggcca cgagtcggac atcaacgcca tctgtttctt ccccaatgga  
EXON 9 / beginning EXON 10

721 gaggccatct gcacgggctc ggatgacgct tcctgccgct tgtttgacct gcgggcagac  
EXON 10

781 caggagctga tctgcttctc ccacgagagc atcatctgcg gcatacagtc cgtggccttc  
EXON 10 polymorphism site acgtc tgt

841 tccctcagtg gccgcctact attcgctggc tacgacgact tcaactgcaa tgtctgggac  
EXON 10

901 tccatgaagt ctgagcgtgt gggcatcctc tctggccacg ataacagggg gagctgcctg  
EXON 10 /beginning EXON 11

961 ggagtcacag ctgacgggat ggctgtggcc acaggttcct gggacagctt cctcaaaatc  
EXON 11

1021 tggaaactga gaggctggag aaagggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc  
EXON 11  
End of Open Reading Frame

1081 tggccgaccc catctcattc aggtgttctc ttctatattc cgggtgccat tcccactaag  
EXON 11



1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc ttggggaggc agcatcaggg  
EXON 11

1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtcctcac  
EXON 11

1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctcccc agccctttgc aggccagca  
EXON 11

1321 gacttgagtc tgagggccca ggccttagga ttctccccc agagccacta cctttgtcca  
EXON 11

"Ban Polymorphism"

tctggcacta cta

1381 ggcctgggtg gtatagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcacca ctagggtcct  
EXON 11

1441 ggcctcttc ttattcatgc ttctccttt ttctacctt tttctctcc taagacacct  
EXON 11

1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt  
EXON 11 POLY A SITE

Appendix 2: Sequence with the two Polymorphism  
(Numbering after the Levine-Sequence)

```
1      gggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT
61     GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTG TGGCCTAGAG
121    GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT
181    TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG
241    CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCCTC GCGCTCCTCC
301    TGGGTCATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC
361    AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG
421    CTTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG
481    ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATTG AGACTGGGCA GCAGAAGACT
541    GTATTTGTGG GACACACGGG TGACTGCATG AGCCTGGCTG TGTCTCCTGA CTTCAATCTC
601    TTCATTTCCG GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC
661    CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCCAATGGA
721    GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGTGTGACCT GCGGGCAGAC
781    CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC TGTGGCCTTC
841    TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC
901    TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG
961    GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTTCT GGGACAGCTT CCTCAAATC
1021   TGGAAGTGAg gaggctggag aaaggggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc
1081   tgcccgaccc catctcattc aggtgttctc ttctatattc cgggtgccat tcccactaag
1141   ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg
1201   acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtccctc
1261   agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctcccc agccctttgc agggccagca
1321   gacttgagtc tgagggcccca ggccttagga ttccctcccc agagccacta cctttgtcca
1381   ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcacta ctagggtcct
1441   ggcctctctc ttattcatgc tttctccttt ttctaccttt ttttctctcc taagacacct
1501   gcaataaagt gtagcaccct ggt
```

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ ~~BLACK BORDERS~~
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**